



**HAL**  
open science

# Caractérisation des WAKs (Wall-Associated Kinases) chez Populus et implication dans la réponse gravitropique

Kévin Tocquard

► **To cite this version:**

Kévin Tocquard. Caractérisation des WAKs (Wall-Associated Kinases) chez Populus et implication dans la réponse gravitropique. 2012, 25 p. + annexes. hal-01267972

**HAL Id: hal-01267972**

**<https://hal.science/hal-01267972>**

Submitted on 6 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## **MASTER II Biologie et Environnement SPECIALITÉ :**

**Génomique, Écophysiologie et Production Végétales (GEPV)**

RAPPORT DE STAGE PRESENTE PAR :

**Tocquard Kévin**

*SUJET :*

**Caractérisation des WAKs (Wall-Associated Kinases) chez *Populus*  
et implication dans la réponse gravitropique**

*Responsables du Stage :*

**Patricia ROECKEL-DREVET et Jean-Stéphane VENISSE**

**UMR PIAF 547**

**Physique et Physiologie Intégratives  
de l'Arbre Fruitier et Forestier  
Les Cézeaux, 24 Avenue des Landais  
63177 Aubière**



**juin 2012**



## Résumé

Pour se redresser, le peuplier produit du bois de tension qui se distingue du bois normal par des caractéristiques physico-chimiques et mécaniques particulières. En trop grande proportion, ce tissu empêche une utilisation optimale du bois. Comprendre la formation du bois de tension est fondamental pour l'amélioration de la qualité du bois. Des protéines transmembranaires liées à la paroi pourraient assurer la perception de la déformation de la paroi cellulaire qui se produit lors de l'inclinaison du tronc. Les WAKs (Wall-associated kinases) présentent les caractéristiques recherchées.

Une analyse *in silico* des WAKs de l'espèce séquencée *Populus trichocarpa* a révélé 120 membres dans cette famille multigénique, réunis majoritairement en « clusters » génomiques. De nouveaux domaines nommés GubWAK, WAK et WAKassoc ont été caractérisés dans les protéines WAK. Associés aux domaines déjà connus (EGF et kinase), ils ont permis de classer les WAKs en 68 *PtWAK*-RLK (Receptor-like kinase), 21 *PtWAK*-RCLK (Receptor-like cytoplasmic kinase), 18 *PtWAK*-RLP (Receptor-like protein) et 13 *PtWAK*-gènes courts. Douze WAKs ont été clonées et séquencées chez *Populus tremula* x *alba* notre matériel d'étude expérimentale. Les expressions différentielles de 8 *PtaWAKs* entre les faces supérieure et inférieure de la tige inclinée suggèrent leur implication dans la perception du stimulus gravitropique.

**Mots-clés :** peuplier, gravitropisme, bois de tension, paroi, wall-associated kinase, analyse *in silico*, PCR quantitative

## Abstract

In poplar, the righting process occurring after tilting of the stem involves the formation of tension wood which differs from normal wood by physicochemical and mechanical characteristics. An excessive proportion of tension wood prevents its industrial use. The understanding of the tension wood formation is critical to improve wood quality. Cell wall linked transmembrane proteins could sense cell wall deformations occurring in tilted stems. WAKs (wall-associated kinases) exhibit such characteristics.

*In silico* analysis of WAKs in *Populus trichocarpa* whose genome has been sequenced has shown 120 members in this multigenic family that are mostly clustered. New domains named GubWAK, WAK and WAKassoc have been characterized in WAK proteins. With already known domains (EGF and kinase) a classification has been made giving 68 *PtWAK*-RLK (Receptor-like kinase), 21 *PtWAK*-RCLK (Receptor-like cytoplasmic kinase), 18 *PtWAK*-RLP (Receptor-like protein) and 13 *PtWAK* « short genes ».

Using our plant material *Populus tremula* x *alba*, 12 WAKs have been cloned and sequenced. Differential expression between upper and lower face of the tilted stems has been observed for 8 *PtaWAKs* suggesting their involvement in graviperception.

**Keywords :** poplar, gravitropism, tension wood, cell wall, wall-associated kinase, *in silico* analysis, quantitative PCR



## **Remerciements**

Je tiens tout d'abord à remercier Jean-Louis JULIEN de m'avoir accueilli au sein de l'UMR 547 PIAF – INRA/UBP afin d'effectuer mon stage de Master recherche 2<sup>ème</sup> année.

Je souhaite également remercier mes deux maîtres de stage, Patricia ROECKEL-DREVET et Jean-Stéphane VENISSE, de m'avoir accordé leur confiance, pour leurs conseils et le soutien qu'ils m'ont apporté tout au long de ce stage. Je les remercie également pour leur grande disponibilité et la patience qu'ils ont eues à mon égard lors de ce stage et de l'écriture de ce rapport.

Mes remerciements sont également adressés à Gisèle BRONNER pour son aide et ses explications précieuses de bioinformatique et de phylogénie.

Je souhaite enfin remercier tous les personnels du PIAF pour les aides et conseils divers qu'ils m'ont offert ainsi que leur bonne humeur quotidienne qui ont rendu ce stage agréable au quotidien. Je souhaite particulièrement remercier Jérôme FRANCHEL pour ses conseils avisés en biologie moléculaire et David LOPEZ pour ses conseils précieux et sa bonne humeur quotidienne qui m'a permis de profiter pleinement de ce stage.



## Liste des abréviations

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire  
ADNg : Acide désoxyribonucléique génomique  
AGP : ArabinoGalactan protein  
ANOVA : ANalysis Of VAriance  
ARN : Acide ribonucléique  
*At* : *Arabidopsis thaliana*  
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool  
cGMP : guanosine 3'-5'-cyclic monophosphate  
CIV : Culture *in vitro*  
Couche G : Couche gélatineuse  
Cq : cycle seuil  
CTAB : Cetyltrimethylammonium bromide  
CPMCW : Cytoskeleton – Plasma Membrane – Cell Wall  
EGF : Epidermal Growth Factor  
EST : Expressed Sequence Tag  
INA : acide 2,6-dichloroisonicotinique  
kDa : kiloDalton  
MAPK : Mitogen-activated protein kinase  
MscL : Mechanosensitive channel of Large conductance  
MscS : Mechanosensitive channel of Small conductance  
NDR1 : NON-RACE SPECIFIC DISEASE RESISTANCE1  
*Os* : *Oryza sativa*  
pb : paire de bases  
PCR : Polymerase chain reaction  
*Pt* : *Populus trichocarpa*  
*Pta* : *Populus tremula x alba*  
RGD : Asparagine – Glycine – Acide aspartique  
RLCK : Receptor-like cytoplasmic kinase  
RLK : Receptor-like kinase  
RLP : Receptor-like protein  
SA : Acide salicylique  
WAK : Wall-associated kinase  
WAKL : Wall-Associated kinase like  
XET : Xyloglucanes endo-transglycosylase





# **Sommaire**

<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>2. BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>2</b>
2.1. - CONTRAINTES MECANIQUES .....	2
2.1.1 – <i>Un bois particulier : le bois de tension</i> .....	3
2.1.2 – <i>La mécanoperception</i> .....	4
2.2 – WAKs, WALL-ASSOCIATED KINASES .....	6
2.2.1 – <i>Structure</i> .....	6
2.2.2 – <i>Liaison des WAKs à la paroi</i> .....	7
2.2.3 – <i>Fonctions physiologiques</i> .....	7
2.2.3.1 – <i>Rôle des gènes WAK</i> .....	7
2.2.3.2 – <i>Rôle des gènes WAK-Like</i> .....	8
2.2.4 – <i>Les WAKs chez le riz (Oryza sativa)</i> .....	9
2.3 – OBJECTIFS DE L’ETUDE .....	10
<b>3. MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>11</b>
3.1. EXTRACTION DES SEQUENCES WAK DES BASES DE DONNEES PUBLIQUES .....	11
3.2. IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES DOMAINES.....	11
3.3. ALIGNEMENT MULTIPLE DE SEQUENCES ET ANALYSE PHYLOGENETIQUE .....	12
3.4. MATERIEL VEGETAL ET CONDITIONS DE CULTURE .....	12
3.5. EXTRACTION ADNG, ARNs, SYNTHÈSE DES ADNC.....	13
3.6. CLONAGE DES WAKs .....	13
3.7. PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL.....	14
<b>4. RESULTATS.....</b>	<b>15</b>
4.1. ANALYSES BIOINFORMATIQUES DES WAKs DU GENOME DE <i>POPULUS TRICHOCARPA</i> .....	15
4.2. CARACTERISATION DES DOMAINES .....	17
4.3. ANALYSE PHYLOGENETIQUE DES WAKs CHEZ <i>POPULUS TRICHOCARPA</i> .....	17
4.4. CLONAGE DES WAKs <i>POPULUS TREMULA X ALBA</i> .....	17
4.5. ETUDE DE L’EXPRESSION DES WAKs CHEZ <i>POPULUS TREMULA X ALBA</i> .....	18
<b>5. DISCUSSION .....</b>	<b>20</b>
5.1. ANALYSE IN SILICO DES WAKs CHEZ <i>POPULUS TRICHOCARPA</i> .....	20
5.2. CARACTERISATION DES DOMAINES PROTEIQUES .....	21
5.3. ANALYSE PHYLOGENETIQUE DES WAKs CHEZ <i>POPULUS TRICHOCARPA</i> .....	22
5.4. EXPRESSION DES GENES WAKs CHEZ LE PEUPLIER <i>POPULUS TREMULA X ALBA</i> .....	23
<b>6. CONCLUSIONS – PERSPECTIVES .....</b>	<b>24</b>



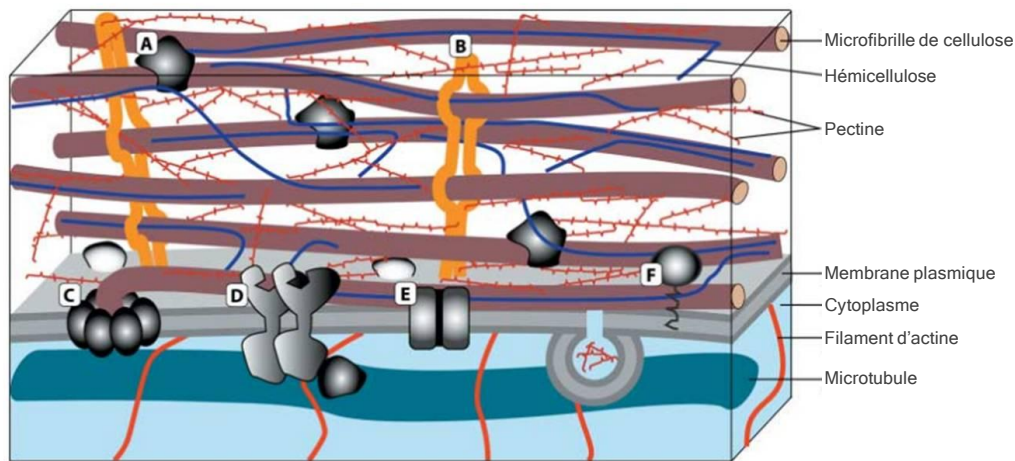
## 1. Introduction

Le peuplier est une espèce importante pour la filière bois. Avec 240 000 ha, la France est le troisième producteur mondial de peuplier. Bien qu'il ne représente que 2% de la surface forestière française, il participe à hauteur de 22% à la récolte de bois d'œuvre feuillu, après le chêne, grâce à sa croissance rapide (<http://www.peupliersdefrance.org/>). Ce matériau polyvalent est utilisé dans diverses industries comme la fabrication d'emballages légers, d'allumettes, de pâte à papier, de contreplaqué, de bois de chauffage, de bardages extérieurs ou encore de parquets.

Pour une utilisation optimale, le bois formé par l'arbre doit être de bonne qualité. La qualité du bois peut en effet varier en fonction des conditions environnementales subies au cours de sa formation. Ainsi, si l'arbre a été penché, par exemples par le vent ou le poids de la neige, il va se redresser en produisant un bois particulier appelé bois de réaction, ou bois de tension chez les feuillus. Ce bois de tension résulte d'une activité accrue du cambium en réponse à l'inclinaison. Chez le peuplier, la principale caractéristique du bois de tension est la présence de fibres gélatineuses. Les parois de ces fibres sont très peu lignifiées mais montrent une couche très riche en cellulose appelée couche G. De part la présence de ces fibres, le bois de tension a des propriétés physiques et mécaniques différentes de celles du bois normal qui compromettent son utilisation dans l'industrie du bois (Jourez, 1997). La compréhension du mécanisme de formation du bois de tension apparait donc comme un point clé pour l'amélioration de la qualité du bois.

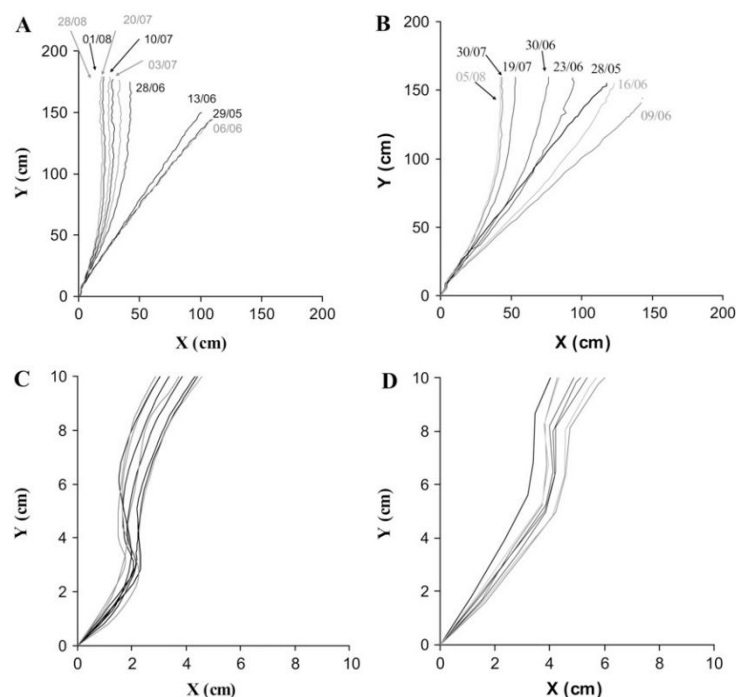
En préambule à la présentation des travaux réalisés dans le cadre de ce master, une première partie bibliographique montrera :

- Quelles sont les contraintes mécaniques que les cellules subissent en permanence au sein du végétal,
- Comment l'inclinaison de l'arbre modifie ces contraintes pour aboutir à la formation de fibres de parois modifiées qui interviennent dans la composition du bois de tension,
- Quelles sont les protéines transmembranaires avec une partie extracellulaire réceptrice qui interviendraient dans la perception de ce stimulus mécanique conduisant à la formation du bois de tension.



**Figure 1. Schéma de la structure d'une paroi primaire végétale** (Humphrey *et al.*, 2007)

Représentation schématique des principaux composants de la paroi végétale. Les microfibrilles de cellulose sont liées par des hémicelluloses au sein d'une matrice composée principalement de pectines. Des protéines sont également présentes au sein de la paroi (A : Expansines, B : Extensines, C : complexe cellulose synthase, D : Récepteurs kinases, E : canaux à ions et F : Protéines ancrée au glycosylphosphatidyl inositol. )



**Figure 2. Cinétiques de redressement d'un arbre** (Coutand *et al.*, 2007)

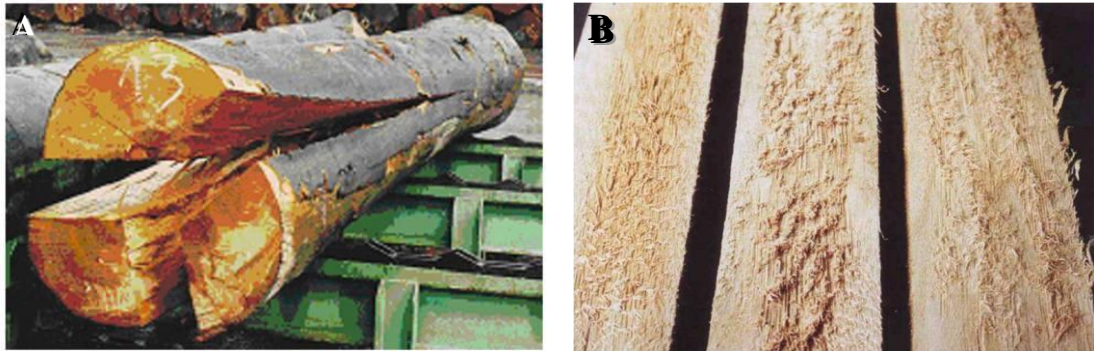
Chaque ligne représente la numérisation du tronc pendant la réponse gravitropique. La date de numérisation est indiquée à côté de chaque ligne. Deux cinétiques différentes sont observables en A et B. Les figures C et D montrent respectivement un zoom effectué à la base des troncs A et B.

## 2. Bibliographie

### 2.1. - Contraintes mécaniques

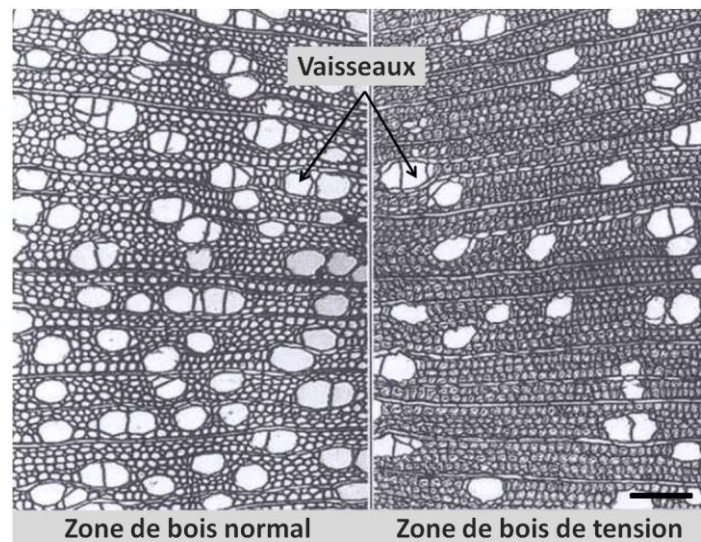
Au cours du développement et de la croissance du végétal, les cellules sont soumises à divers stimuli mécaniques dont certains sont permanents. Parmi les stimuli mécaniques permanents, la pression de turgescence s'applique de manière uniforme et homogène sur la paroi de la cellule végétale. La structure de cette paroi est rappelée Figure 1. Toutefois, la pression exercée sur les cellules environnantes dépend de la structure cellulosique de la paroi : si les microfibrilles de cellulose sont orientées de façon uniforme dans toutes les directions (isotropie), la cellule se développera de manière sphérique, tandis que si elles sont orientées perpendiculairement à son axe final, la cellule présentera une forme longiligne (Schopfer, 2006). L'orientation et la formation des microfibrilles de cellulose sont contrôlées par le complexe protéique membranaire cellulose synthase. Ce dernier est guidé par les faisceaux de microtubules du cytosquelette qui déterminent l'orientation des microfibrilles (Crowell *et al.*, 2009). Cette orientation est spécifique de chaque strate de la paroi primaire et secondaire (Somerville *et al.*, 2004). En plus de la pression de turgescence interne, la cellule subit la pression des cellules adjacentes et les contraintes transmises depuis des cellules plus lointaines ainsi que celles résultantes d'événements extérieurs tels le vent et la neige (Mouliat *et al.*, 2006). La gravité provoque également un poids d'autant plus important que la masse du végétal est élevée, inférant des contraintes directes sur les cellules. La structure d'un arbre dont la durée de vie excède plusieurs dizaines d'années est en constante évolution ; il en est donc de même pour les contraintes subies par les cellules au sein de cet organisme. En particulier, lors d'un stimulus gravitropique (inclinaison de l'axe du végétal par rapport à la verticale, ce qui peut survenir suite à une tempête, au poids de la neige sur un arbre ou à après un glissement de terrain) les efforts mécaniques sont différents, et les niveaux de contraintes sont donc changés : par exemple un arbre que l'on incline présente des bras de leviers plus grands pour l'action des poids répartis dans sa structure, et va donc subir des contraintes de flexions augmentées, même si sa masse reste inchangée.

De nombreuses études appréhendant les effets d'un stimulus gravitropique ont été conduites sur des plantes herbacées et plus particulièrement au niveau de la racine (Bancaflor et Masson, 2003). Les travaux portant sur le redressement des parties aériennes des arbres suite à une inclinaison par rapport à la verticale sont beaucoup plus rares. Coutand *et al.* (2007) observent la cinématique de redressement chez le peuplier et mettent en évidence que l'axe se



**Figure 3. Dommages dus à la présence de bois de tension**

- A. Fentes à l'abattage résultant du relâchement des tensions accumulées lors de la croissance (<http://www.fao.org/>).
- B. Les lamelles de peuplier présentent un état pelucheux en raison d'une forte quantité de couche G au sein du bois (Jourez, 1997).



**Figure 4. Coupe transversale de bois de peuplier (*Populus euramericana*) (Jourez, 1997)**

Des coupes transversales de bois normal et de bois de tension de peuplier observées en microscopie optique montrent une diminution importante du nombre de vaisseaux. La barre d'échelle représente 100 µm.

redresse suivant 3 phases : une phase de latence, suivie d'une phase de redressement gravitropique, puis d'une décourbure anticipée (Figure 2).

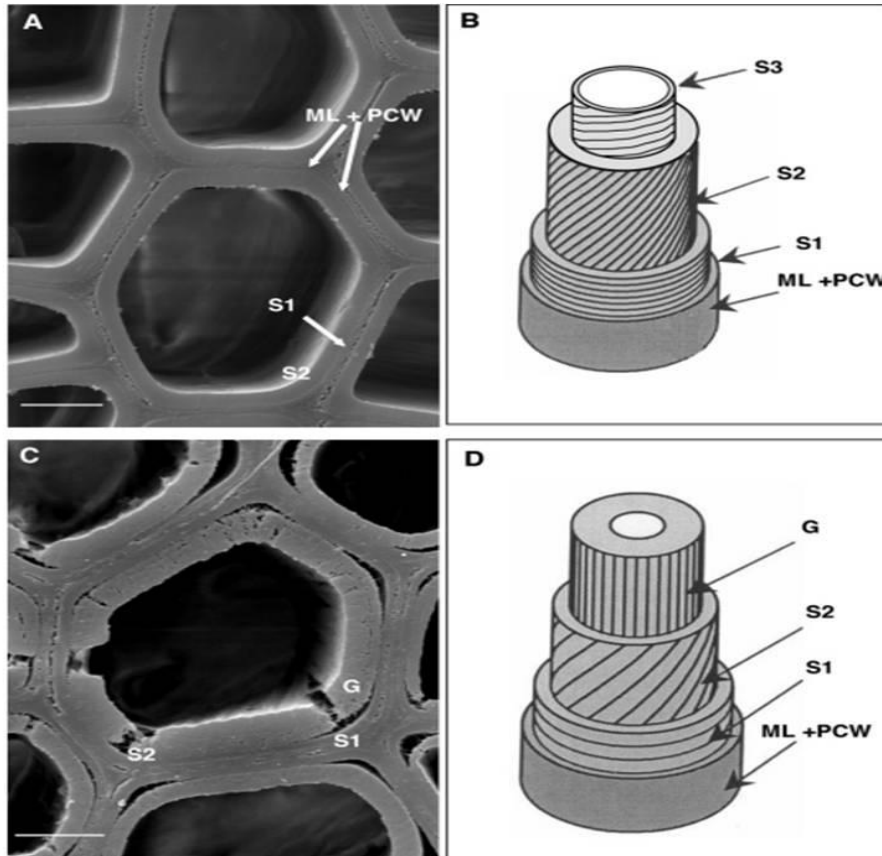
Les moteurs de redressement de l'axe sont différents selon que la zone contrainte est apicale en croissance primaire ou subapicale en croissance secondaire (Moullia et Fournier, 2009). Dans les tissus primaires, la courbure gravitropique est due à une élongation différentielle entre les cellules de la face supérieure et inférieure. Pour les tissus secondaires, cette courbure est due au fonctionnement différentiel du cambium qui produit le bois dit « de réaction » (Telewski, 2006). Ce bois de réaction correspond au bois de tension chez les angiospermes et au bois de compression chez les gymnospermes (Jourez, 1997 ; Telewski, 2006). Grâce à la formation de l'un ou l'autre de ces bois de réaction, l'axe va se redresser.

### *2.1.1 – Un bois particulier : le bois de tension*

Le bois de tension se distingue du bois normal par ses caractéristiques anatomiques, chimiques, physiques et mécaniques particulières. Pour le végétal, la formation de ce bois est un mécanisme primordial pour se développer en réponse à son environnement. Toutefois, au-delà d'une certaine proportion, il devient dommageable pour la qualité du matériau utilisé (Jourez, 1997). Les difficultés se rencontrent dès l'opération de récolte en forêt où se produisent des éclatements de grumes ou des fentes à l'abattage (Figure 3A). D'autres difficultés sont également rencontrées : des problèmes apparaissent lors du sciage, le bois présente un aspect pelucheux (Figure 3B), le bois présente des difficultés d'usinage et les planches se déforment au séchage. De plus, la pâte à papier produite est de qualité médiocre (Jourez, 1997). Par conséquent, comprendre le mécanisme de formation de ce bois est essentiel pour développer des stratégies d'amélioration de la qualité du bois.

Le caractère le plus représentatif du bois de tension est la diminution du nombre de vaisseaux (Jourez *et al.*, 2001 ; Figure 4). C'est une modification retrouvée chez toutes les espèces généralement accompagnée d'un regroupement de ces vaisseaux. Certains caractères du bois de tension sont spécifiques à certaines espèces comme la modification de la forme des vaisseaux, de leur surface, du diamètre des fibres, de l'épaisseur des parois ou encore de la formation de la couche G au niveau de la paroi. Cependant, la couche G n'est pas présente chez toutes les espèces et ne peut être considérée comme un facteur essentiel pour l'établissement du bois de tension. Les différences physiques et mécaniques entre le bois normal et le bois de tension sont expliquées par l'analyse de l'ensemble des éléments de structure et d'ultrastructure.





**Figure 5. Organisation tissulaire de la paroi secondaire de cellules xylémiennes différenciées dans un bois normal et un bois de tension de peuplier.** (Déjardin, 2010)

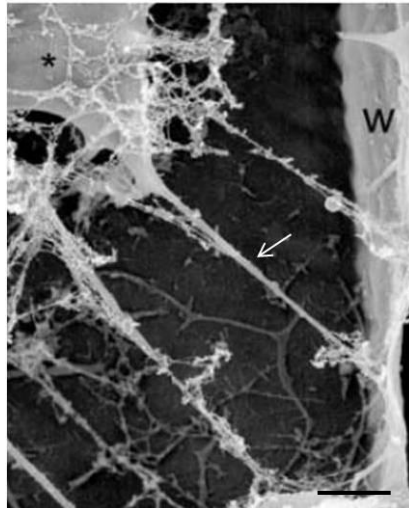
La paroi secondaire présente différentes strates. Les photos de microscopie électronique à balayage (A-C) et les schémas représentatifs (B-D) de bois normal (A-B) et de bois de tension (C-D) montrent les différentes strates de la paroi secondaire de cellules xylémiennes de peuplier. La couche G est retrouvée dans le bois de tension (C-D) mais absente dans le bois normal (A-B). Il est intéressant de noter l'orientation des microfibrilles de cellulose différente dans chaque strate représentée par les traits des schémas. ML : Lamelle moyenne. PCW : paroi primaire. S1, S2, S3 : couches de la paroi secondaire. G : couche gélatineuse. La barre d'échelle représente 5 $\mu$ m.

Chez notre modèle d'étude le peuplier, la couche G est cependant considérée comme caractéristique du bois de tension. Elle comporte un faible taux de lignine et est principalement composée de microfibrilles de cellulose à hauteur de 98% (Joseleau *et al.*, 2004 ; Gierlinger *et al.*, 2006). Dans cette couche, les microfibrilles sont parallèles entre elles, orientées selon l'axe longitudinal de la cellule (Figure 5), alors que l'angle des microfibrilles diffère dans les autres couches de la paroi secondaire. Les cristaux de cellulose des microfibrilles sont différents selon les bois : 3,6 nm ou 3,31 nm dans le bois de tension, et de 3,2 nm ou 2,65 nm dans le bois opposé (Daniel *et al.*, 2006). En ce qui concerne les autres polysaccharides pariétaux, des pectines sont aussi retrouvées dans la couche G alors que normalement elles sont plutôt présentées comme composantes majeures de la paroi primaire et de la lamelle moyenne. Dans le bois de tension de peuplier, on trouve des (1,4)- $\beta$ -D-galactane dans la zone séparant S2 et la couche G. Toutefois, ce motif glucidique peut être aussi présent dans les pectines et dans les hémicelluloses. La composition protéique de cette couche G est également singulière. Des arabinogalactanes (AGPs) sont situées à la limite de la couche G et de la lumière cellulaire (Lafarguette *et al.*, 2004). Il s'agit de protéines hautement glycosylées impliquées dans la structuration et stabilisation des parois. Des expansines, protéines non enzymatiques dont l'action est d'affaiblir les liaisons H entre microfibrilles de manière pH dépendantes, sont impliquées dans la régulation de l'élongation cellulaire. Ensuite, des extensines sont impliquées dans la rigidification de la paroi et interviennent dans la liaison de la couche G à la couche précédente. A l'heure actuelle, aucune donnée n'est disponible sur l'implication des extensines dans la formation du bois de tension. Enfin, les xyloglucanes endo-transglycosylase (XET) sont des enzymes dont l'expression et l'activité sont augmentées dans le bois de tension (Nishikubo *et al.*, 2007). Ces enzymes peuvent être impliquées dans le remodelage de la paroi cellulaire (pendant son élongation mais aussi lors de la formation de la paroi secondaire) au travers d'une activité enzymatique sur les xyloglucanes (hémicelluloses).

### 2.1.2 – La mécanoperception

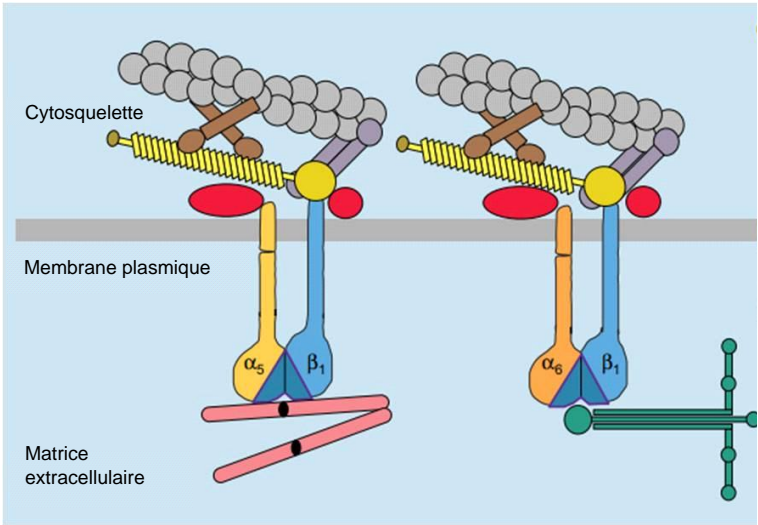
La variable perçue par la cellule au cours d'un stimulus mécanique est la déformation des tissus, c'est-à-dire le raccourcissement et/ou l'extension (Coutand et Moulia, 2000).

Deux hypothèses concernant la perception des déformations par la cellule végétale sont avancées. Premièrement, la perception des déformations mécaniques serait assurée par différents acteurs moléculaires, dont les canaux ioniques mécanosensibles. Ces canaux membranaires s'ouvriraient soit directement à cause de la force exercée sur la membrane



**Figure 6. Photo en microscopie électronique d'une cellule plasmolysée** (Lang et al., 2004)

La photo en microscopie électronique confocale à balayage laser montre une cellule plasmolysée. Les faisceaux d'Hechtian sont indiqués par la flèche. W : Paroi. \* : Protoplaste plasmolysé. Barre d'échelle : 1µm.



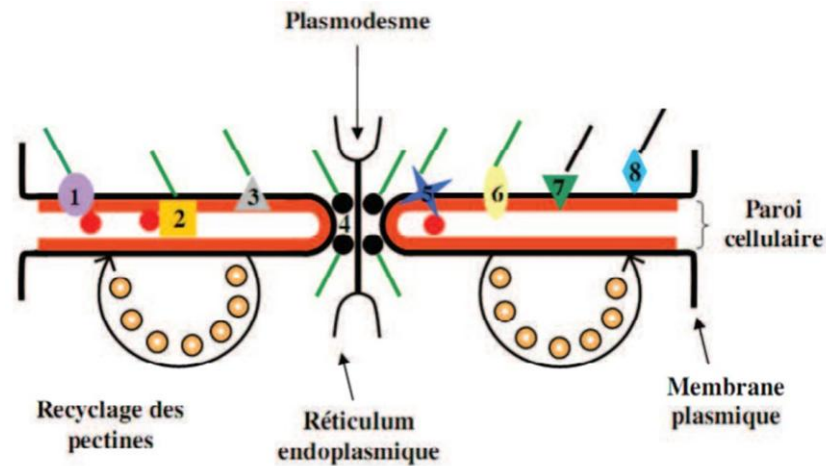
**Figure 7. Représentation schématique des connexions transmembranaires entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette chez les animaux** (Hynes, 1999)

Les intégrines ( $\alpha_5/\beta_1$ ,  $\alpha_6/\beta_1$ ) sont liées aux protéines extracellulaires comme la fibronectine (rose) ou la laminine (vert). Elles sont liées le plus souvent au niveau de motifs RGD (Arg-Gly-Asp) des protéines de la matrice extracellulaire. Les intégrines sont également liées à des protéines cytoplasmiques comme la taline (jaune) ou l' $\alpha$ -actinine (violet). Ces-dernières sont liées à la vinculine (marron) et aux microfilaments d'actine (gris).

(Jaffe *et al.*, 2002), soit indirectement *via* des liens entre les canaux, le cytosquelette et la matrice extracellulaire (Gillepsie et Walker, 2001). Les canaux ioniques ont surtout été étudiés chez *Escherichia coli*. Il s'agit des MscL (Mechanosensitive channel of Large conductance ; Price *et al.*, 2011) et des MscS (Mechanosensitive channel of Small conductance ; Malcolm *et al.*, 2011).

Chez les végétaux, des canaux ioniques mécanosensibles ont été identifiés par patch-clamp au niveau de la membrane plasmique. Il s'agit de canaux transporteurs d'ions  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  (Cosgrove et Hedrich, 1991 ; Ding et Pickard, 1993). Récemment, des canaux homologues des Msc bactériens ont été clonés chez les plantes et leur fonctionnalité est en cours d'étude (Haswell *et al.*, 2008). La deuxième hypothèse stipule que le continuum CPMCW pour Cytoskeleton – Plasma Membrane – Cell Wall convertirait le signal mécanique en un signal chimique ou électrique (Baluška *et al.*, 2003 ; Telewski, 2006). En effet, le cytosquelette de part sa capacité d'adhésion à la membrane plasmique permettrait une interaction complexe entre les forces mécaniques et les signaux chimiques. Il a été observé que le couplage entre la paroi, la membrane plasmique et le cytosquelette se fait grâce aux faisceaux de Hecht (Figure 6) constitués de microfilaments d'actine, de microtubules et de réticulum endoplasmique. Ce lien est particulièrement visible lors d'événements de plasmolyse (Lang *et al.*, 2004).

Chez les animaux, le couplage cytosquelette-matrice extracellulaire est assuré, entre autres, par des intégrines transmembranaires. Ces protéines se lient aux motifs RGD (Arg-Gly-Asp) de protéines présentes dans l'espace extracellulaire telles les fibronectine, vitronectine et laminine (Hynes, 1999). Du côté intracellulaire, ces intégrines sont connectées aux protéines de type taline, paxilline et tensine qui vont recruter une seconde série de protéines (profiline, VASP, Arps) liées à l'actine pour sa polymérisation (Baluška *et al.*, 2003 ; Figure 7). Ces intégrines présentent la particularité de transmettre des signaux *via* la modulation de cascades de phosphorylation assurées par des MAPKs (mitogen-activated protein kinases). Chez les végétaux, des protéines de type « integrin-like » capable de reconnaître le motif RGD de protéines extracellulaires non identifiées ont été mises en évidence. Enfin, la protéine *AtNDR1* (NON-RACE-SPECIFIC DISEASE RESISTANCE1) chez *Arabidopsis thaliana* présente une forte homologie avec les intégrines animales et a un rôle dans la liaison entre la membrane plasmique et la paroi (Knepper *et al.*, 2011). Toutefois, du fait du caractère singulier de la paroi cellulaire végétale qui est essentiellement composée de structures glucidiques (par opposition à l'espace extracellulaire animal de structure essentiellement protéique), d'autres candidats moléculaires doivent être potentiellement impliqués dans le



**Figure 8. Représentation schématique des protéines potentielles de liaison entre le cytosquelette, la membrane plasmique et la paroi** (Baluška *et al.*, 2003)

Ce schéma représente la jonction entre 2 cellules de racine avec un plasmodesme traversé par un élément de réticulum endoplasmique. Les protéines de liaison potentielle entre le cytoplasme, la membrane plasmique et la paroi sont : 1) les WAKs (Wall-associated kinases), 2) les AGPs (Arabinogalactan proteins), 3) les calloses synthases, 4) les myosines de classe VIII spécifiques des plantes, 5) des RLK (Récepteurs-like kinase), 6) les formines, 7) les celluloses synthase et 8) les phospholipases D. Ces protéines sont supposées interagir directement ou indirectement avec les éléments du cytosquelette que sont les filaments d'actine (trait vert) et les microtubules (trait noir).

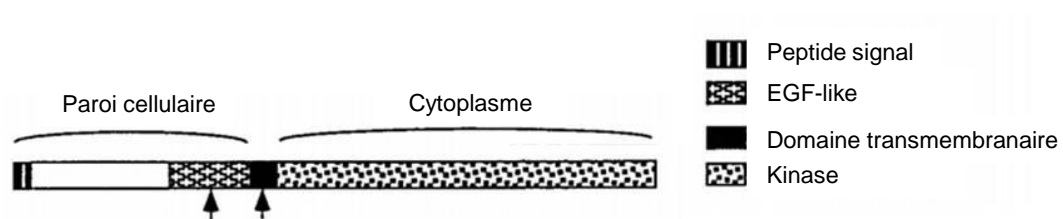
continuum CPMCW (Baluška *et al.*, 2003). Les WAKs (Wall-Associated Kinases), les AGPs (ArabinoGalactan Proteins), les formines, des myosines de classe VIII spécifiques aux plantes, des phospholipases D et des callose-synthases (Baluška *et al.*, 2003 ; Figure 8) pourraient assurer ce rôle. Parmi ces candidats, la famille des WAKs présente un intérêt particulier car elles ont une conformation transmembranaire avec une région extracellulaire qui autorise leur liaison à la paroi, et une région intracellulaire qui s'intègre dans les cascades de transduction cytoplasmique. Ces régions seront exhaustivement détaillées dans les paragraphes suivants. Par conséquent, nous estimons que ces WAKs présenteraient une conformation idéale pour ressentir les déformations pariétales, informer les cellules du bois de l'existence de contraintes, et *in fine* initier la formation de bois de tension.

## 2.2 – WAKs, Wall-Associated Kinases

Les WAKs ont principalement été étudiées chez *Arabidopsis thaliana*. Vingt-six gènes avec 5 membres *AtWAK* et 21 membres *AtWAK-like* (*AtWAKLs*) ont été identifiés dans le génome d'*A.thaliana* (He *et al.*, 1999 ; Verica et He, 2002). Les 5 gènes *AtWAKs* (*AtWAK1-5*) se répartissent en un « cluster » de 30 Kb sur le chromosome 1 (He *et al.*, 1999). Quant aux 21 gènes *AtWAK-like*, ils ont été découverts ultérieurement par BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sur le génome d'*A.thaliana* en utilisant comme requête les séquences ADNc et protéique de *AtWAK1* (Verica et He, 2002). Ces gènes sont répartis en petits « clusters » le long des 5 chromosomes. Leurs protéines sont impliquées dans diverses fonctions physiologiques comme la résistance aux agents phytopathogènes, la tolérance aux métaux lourds ou encore dans le développement de la plante.

### 2.2.1 – Structure

La structure protéique déduite des 5 séquences géniques *AtWAKs* a été analysée. Les protéines sont composées d'une partie N-terminale apoplastique, d'un unique domaine transmembranaire et d'une partie C-terminale cytoplasmique (He *et al.*, 1999). Cette dernière possède un domaine Sérine/Thréonine kinase très conservé, d'environ 86% de similarité entre les membres. Les parties extracellulaires des 5 *AtWAKs* sont similaires de 40 à 64%. Chacune possède un domaine EGF-like (Epidermal Growth Factor) adjacent au domaine transmembranaire. Chez *Arabidopsis*, deux types de domaine EGF-like ont été rapportés : EGF-2 et EGF-Ca<sup>2+</sup>. Chez les animaux, les domaines EGF participent à la dimérisation de protéines dans des conformations induites par le calcium (Stenflo *et al.*, 2000). D'un point de vue génomique, ces gènes possèdent 2 introns dont les positions sont relativement bien



**Figure 9. Représentation schématique de la structure protéique des WAKs chez *Arabidopsis thaliana* (He *et al.*, 1999)**

La partie cytoplasmique C-terminale contient un domaine kinase. En amont du domaine transmembranaire se trouve un domaine EGF-like dans la partie extracellulaire. Les flèches correspondent à la position conservée des 2 introns.

conservées. Le premier est situé juste en amont du domaine EGF, tandis que le second est localisé entre le domaine EGF et le domaine transmembranaire (Figure 9).

Quant aux 21 protéines *AtWAK*-like, des singularités se précisent (Verica et He, 2002 ; Verica *et al.*, 2003). Dix-sept *AtWAK*-like possèdent une structure transmembranaire comparable aux 5 *AtWAK*s. Toutefois, ces séquences montrent une moins bonne conservation de la partie extracellulaire, et les domaines EGF sont altérés. La structure génomique intron/exon est quant à elle comparable. Les 5 autres gènes *AtWAK*-like codent des protéines de petites tailles, qui ne présentent que la partie kinase ou la partie extracellulaire des gènes *AtWAK*.

### 2.2.2 – Liaison des WAKs à la paroi

La structure des WAKs leur confère un intérêt particulier dans l'étude du continuum CPMCW. Elles possèdent un domaine kinase intracellulaire, impliqué dans des cascades de phosphorylation, et ont aussi la propriété de se lier à la paroi *via* leur domaine extracellulaire (He *et al.*, 1996). Les *AtWAK*s peuvent être séparées de la paroi par des pectinases (Wagner et Kohorn, 2001), suggérant un rôle crucial des pectines dans la qualité de ces liaisons *AtWAK*s-paroi. Ceci a été confirmé en utilisant des anticorps anti-WAK et anti-pectine qui reconnaissent le même complexe de 68 kDa par western blot (Wagner et Kohorn, 2001). *AtWAK1* peut se lier dans une conformation induite par le calcium à des acides polygalacturoniques, à des oligogalacturonides et à des pectines extraites de paroi d'*Arabidopsis* (Decreux et Messiaen, 2005 ; Decreux *et al.*, 2006). Cette liaison a été montrée par Brutus *et al.* (2010) entre la protéine *AtWAK1* et des oligogalacturonides.

### 2.2.3 – Fonctions physiologiques

#### 2.2.3.1 – Rôle des gènes WAK

Chez *A.thaliana*, le gène *AtWAK1* participe à l'établissement des réponses de défense végétale lors d'attaques d'agents infectieux (He *et al.*, 1998). En effet, l'expression du gène *AtWAK1* est activée lors d'une inoculation ou lors d'une simulation d'attaque infectieuse par ajout d'acide salicylique (SA) ou d'un analogue structural INA (2,6-dichloroisonicotinic acid). De même, une plante possédant un gène *AtWAK1* antisens, ou alors un allèle négatif dominant, est sensible à une simulation d'attaque pathogène par de l'INA. Une expression ectopique de *AtWAK1* permet aux plantes mutantes d'être résistantes à des concentrations normalement létales de SA (He *et al.*, 1998). Enfin, une augmentation de la concentration en aluminium augmente l'expression du gène et la quantité de protéine *AtWAK1* dans les racines





d'*Arabidopsis*. Une surexpression d'*AtWAK1* améliore la tolérance des plantes à l'aluminium (Sivaguru *et al.*, 2003).

Une diminution de la quantité de protéines *AtWAKs* (construction antisens) provoque une diminution de l'élongation cellulaire et l'apparition d'un phénotype nain chez *Arabidopsis thaliana*. De plus, un mutant *wak2-1* montre une dépendance pour les sucres et les sels pour sa croissance (Kohorn *et al.*, 2006). Cette mutation diminue également l'expression d'une invertase vacuolaire (Kohorn *et al.*, 2009). L'analyse de ce mutant *wak2-1* a également montré une surexpression d'*AtMAPK3* par les pectines de manière *AtWAK2*-dépendante. *AtMAPK3* est un gène impliqué dans des voies de régulation du développement cellulaire ainsi que les réponses à différents stress notamment biotiques. L'ensemble de ces observations suggère qu'*AtWAK2* a un rôle sur la régulation de la pression de turgescence des cellules, et par conséquent sur l'élongation cellulaire (Kohorn *et al.*, 2009).

L'expression d'un gène *AtWAK4* antisens par un promoteur inductible à la dexaméthasone diminue la quantité de protéine *AtWAK*. Cela provoque un brusque arrêt de l'élongation cellulaire, et un arrêt de développement des plants d'*Arabidopsis*. La germination n'est pas altérée, mais l'élongation des racines, des hypocotyles ainsi que le développement des feuilles sont bloqués (Lally *et al.*, 2001).

#### 2.2.3.2 – Rôle des gènes WAK-Like

Chez *Arabidopsis thaliana*, le rôle physiologique des 7 *AtWAK-like* (*AtWAKL1-7*), a aussi été étudié (Verica *et al.*, 2003, Hou *et al.*, 2005). Les différents gènes, réunis en un « cluster », sont exprimés dans la plupart des tissus mais présentent des variations dans leur niveau d'expression. L'expression des gènes *AtWAK-like* est dépendante des conditions physiologiques de la plante. De manière générale, ces gènes sont principalement exprimés dans les racines et les fleurs, contrairement aux gènes *AtWAKs* qui le sont principalement dans les tissus verts. Comme *AtWAK1*, l'expression d'*AtWAKL5* et *AtWAKL7* est induite par un apport d'acide salicylique ou d'INA, suggérant la possibilité d'une intervention de ces protéines dans la réponse aux attaques phytopathogènes (Verica *et al.*, 2003). L'expression d'*AtWAKL4* est induite par les ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ . Le promoteur d'*AtWAKL4* rendu non fonctionnel annule son induction par ces ions sauf vis-à-vis de  $\text{Ni}^{2+}$  et entraîne l'hypersensibilité des plantes aux ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , et  $\text{Zn}^{2+}$ , mais étrangement leur tolérance à l'ion  $\text{Ni}^{2+}$ . *AtWAKL4* régule aussi les gènes de transporteur de zinc lors d'une carence.



Le mutant *wakl-4* montre en effet une diminution de l'accumulation de l'ion  $Zn^{2+}$  dans les tiges (Hou *et al.*, 2005).

Meier *et al.* (2012) ont montré que le gène *AtWAKL10* est co-exprimé avec de nombreux gènes de réponse aux agents phytopathogènes. De plus, *AtWAKL10* est une protéine à double action enzymatique : sa partie C-terminale cytoplasmique peut agir en tant que kinase et de guanylyl synthase dans la formation du cGMP (guanosine 3',5'-cyclic monophosphate). Ces deux activités interviennent dans les premières étapes de transduction de signaux.

#### 2.2.4 – Les WAKs chez le riz (*Oryza sativa*)

Chez le riz (*Oryza sativa* subsp. *japonica*), 125 gènes WAKs ont été découverts par une analyse *in silico* sur le génome (Zhang *et al.*, 2005). Parmi ces 125 gènes, 67 sont des *OsWAK-RLKs* (Receptor-like kinases) contenant à la fois les domaines kinases intracellulaires et EGF extracellulaire, 28 sont des *OsWAK-RLCKs* (Receptor-like cytoplasmic kinases) contenant uniquement le domaine kinase cytoplasmique, 13 sont des *OsWAK-RLPs* (Receptor-like protein) contenant seulement un domaine EGF extracellulaire et 12 sont des *OsWAKs* « short genes » sans domaine particulier mais dont l'identité des séquences en acides aminés est  $\geq 40\%$  d'identité aux *OsWAKs* transmembranaires. Enfin, 5 séquences sont des pseudogènes. Les 125 WAKs sont réparties sur les 12 chromosomes et sont pour la plupart organisés sous forme de « clusters » (Zhang *et al.*, 2005).

D'un point de vue fonctionnel, le gène *OsWAK1* n'est exprimé de manière constitutive que faiblement dans les racines. Toutefois, *OsWAK1* est, comme *AtWAK1*, *AtWAKL5*, *AtWAKL7* et *AtWAKL10*, impliqué dans la réponse aux agents pathogènes (Li *et al.*, 2009). Une attaque par le champignon *Magnaporthe oryzae* provoque une expression du gène *OsWAK1* dans les feuilles de riz. Les mutants surexprimant ce gène sont résistants à *M. oryzae*. De plus, le génotype sauvage surexprime *OsWAK1* lors d'induction d'acide salicylique ou de méthyl-jasmonate mimant une attaque pathogène. Enfin, *OsWAK1* est capable de s'autophosphoryler ainsi que de phosphoryler la protéine *OsRFP1*, un facteur de transcription à doigt de zinc.

Un autre gène appelé *OsiWAK1* (pour *Oryza sativa indica*) est quant à lui impliqué au même titre qu'*AtWAK2* et *AtWAK4*, dans le développement cellulaire (Kanneganti et Gupta, 2011). Les mutants obtenus où *OsiWAK1* est sous-exprimé (par la technique RNAi) montrent un phénotype nain, du à la réduction de la taille des cellules. A nouveau, uniquement l'élongation et non la division cellulaire est affectée (Lally *et al.*, 2001).

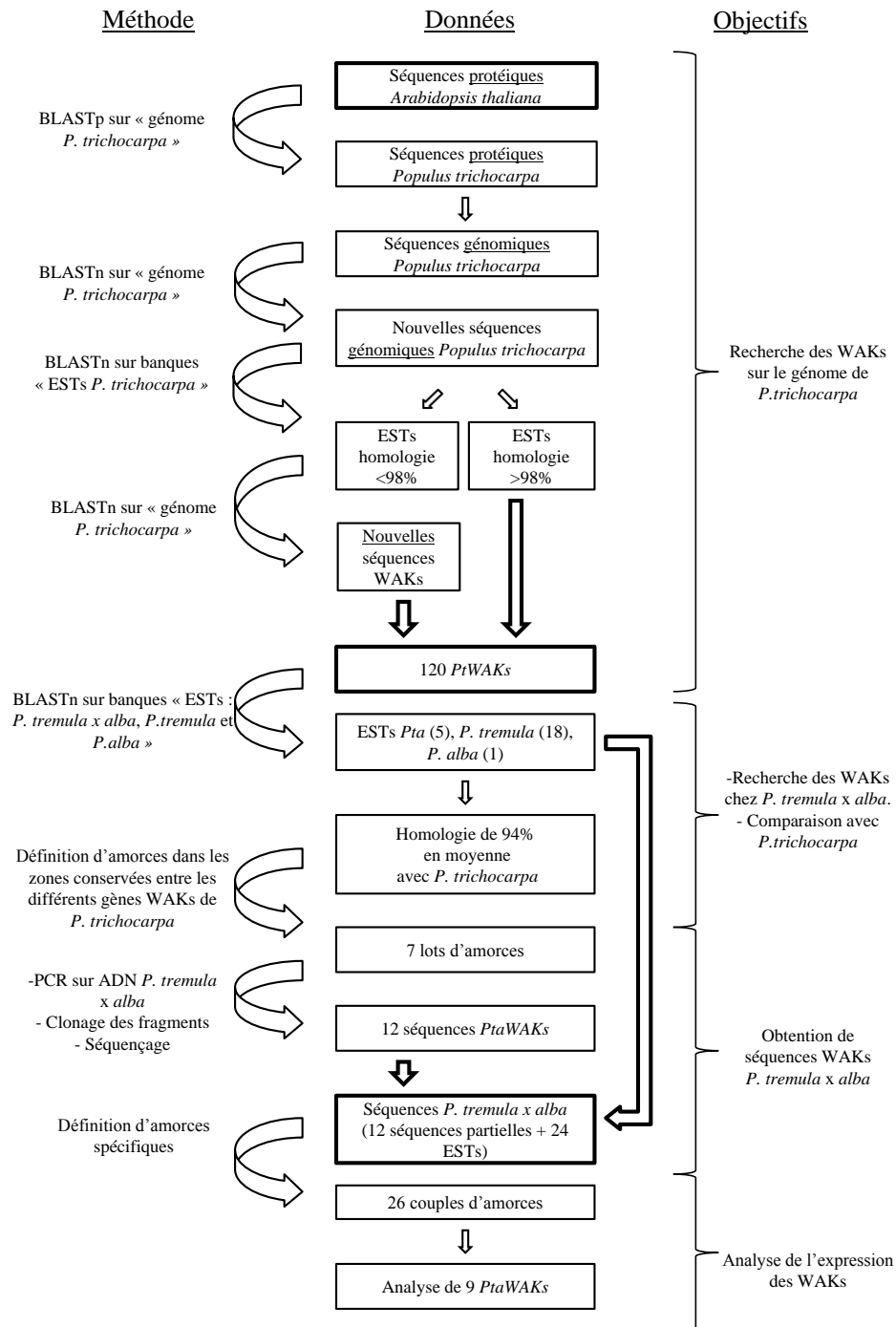


### 2.3 – Objectifs de l'étude

L'étude des gènes *WAKs* a été effectuée chez l'arabette (He *et al.* 1999 ; Verica et He, 2002) et chez le riz (Zhang *et al.*, 2005). Paradoxalement, les données physiologiques sur ces *WAKs* restent limitées, et aucune étude de cette famille n'a été rapportée chez une espèce ligneuse. Dans la formation du bois de tension, l'interaction entre les éléments du cytosquelette et de la paroi a un rôle clé pour permettre à la plante de répondre en fonction de la sollicitation gravitropique qu'elle perçoit (Telewski, 2006). Dans ces contextes physiologique et moléculaire, nous émettons l'hypothèse que les *WAKs*, protéines du continuum CPMCW, auraient un rôle majeur dans la perception du stimulus gravitropique conduisant à la formation du bois de tension.

L'objectif de mon stage de Master recherche 2<sup>ème</sup> année au sein de l'UMR PIAF 547 dans l'équipe MECA (Contraintes mécaniques et activité des zones en croissance) est d'identifier des *WAKs* chez le peuplier qui pourraient être impliquées dans la réponse précoce au stimulus gravitropique conduisant à la formation du bois de réaction. Pour répondre à notre hypothèse de travail, le stage a été organisé en 2 parties complémentaires :

- (i) Identification, caractérisation *in silico* et analyse phylogénétique des gènes *WAKs* dans le génome du peuplier *Populus trichocarpa*, le seul séquencé (Tuskan *et al.*, 2006),
- (ii) Clonage, séquençage et suivi d'expressions après stimulus gravitropique de *WAKs* du peuplier *Populus tremula* x *alba*, notre matériel végétal d'étude expérimentale.



**Figure 10. Schéma synthétique des différentes étapes conduisant à l'analyse l'expression des WAKs chez *Populus tremula x alba***

*PtWAKs* : *Populus trichocarpa* wall associated kinase

*PtaWAKs* : *Populus tremula x alba* wall associated kinase

### 3. MATERIELS ET METHODES

#### 3.1. Extraction des séquences WAK des bases de données publiques

Les séquences nucléotidiques et protéiques prédites de WAKs sont extraites de la base de données Phytozome (<http://www.phytozome.fr/>) établie sur l'annotation (version JGI v2.0) du génome du peuplier actuellement séquencé *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray ex Hook). Les séquences protéiques AtWAK1-5 d'*Arabidopsis thaliana* sont utilisées comme requête pour effectuer un BLASTp (protein Basic Local Alignment Search Tool, [http://www.phytozome.net/search.php?show=blast&method=Org\\_Ptrichocarpa](http://www.phytozome.net/search.php?show=blast&method=Org_Ptrichocarpa)) en utilisant les paramètres par défaut. Les séquences protéiques PtWAK montrant au moins 40% d'identité sont collectées. Afin d'extraire de nouvelles séquences WAK qui n'auraient pas été identifiées lors de cette première collecte, les séquences génomiques correspondantes sont utilisées subséquentement comme requête en BLASTn (nucleotide BLAST) sur ces mêmes banques Phytozome. L'ensemble de ces séquences génomiques PtWAKs a alors été utilisé pour une recherche d'ESTs (Expressed Sequence Tags) sur le site NCBI, National Center of Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) en élargissant cette recherche aux espèces *Populus trichocarpa*, *Populus tremula x alba*, *Populus tremula* et *Populus alba*. Ces ESTs ont été utilisées (i) comme matrice afin de vérifier les annotations théoriques des WAKs, (ii) comme outils pour chercher de nouvelles séquences qui n'auraient pas été identifiées lors des précédents BLAST (lorsque l'homologie d'un EST est <98%, cet EST est considéré comme une nouvelle isoforme de WAK et donc utilisé comme requête pour effectuer un BLASTn dans Phytozome), et (iii) pour apprécier le niveau de polymorphisme des séquences génomiques WAK chez les différentes espèces de peuplier.

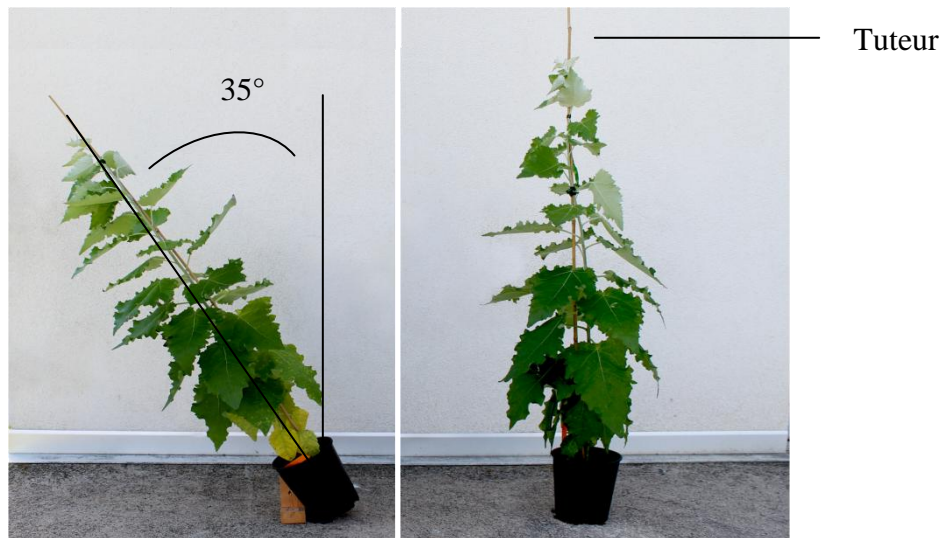
La figure 10 schématise les différentes étapes du processus de recherche des séquences WAK chez le peuplier.

#### 3.2. Identification et caractérisation des domaines

L'identification nominative des différents domaines caractéristiques de la famille des wall-associated kinases est réalisée à partir de la base de données PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/> ; Punta *et al.*, 2012) accessible *via* NCBI.

Pour une caractérisation fine des domaines nuancés, en l'occurrence l'identification des acides aminés conservés, les régions des domaines prédits sont alors extraites de l'alignement des séquences protéiques prédites à l'aide du programme MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>; Edgar, 2004). Les résultats partiels d'alignement agencés sous format fasta sont ensuite analysés grâce au programme MEME (Multiple





**Figure 11. Représentation de l'inclinaison d'un peuplier *Populus tremula x alba***

Les peupliers sont tutorés deux semaines avant le début de l'expérience, dans laquelle les peupliers sont inclinés selon un angle de 35° par rapport à l'axe vertical.

Nom du couple d'amorces	Séquence de l'amorce sens (5'-3')	Séquence de l'amorce antisens (5'-3')	Tm °C
<b>Lot 1</b>	GGTAACCCTTACCTTGAACCTGGTT	CCAAAAGTACCCTGCACATGAGT	58
<b>Lot 2 A</b>	GGCTTTGAAGGCAATCCTTATATT	GGATCCAAGTACCCGAAGGTG	57
<b>Lot 2 B</b>	GGCTTCGWAGGAAATCCTTATCTT	GGATCCAAGTACCCAAAGGTG	55
<b>Lot 3 A</b>	GGCTATCAAGGAAATCCATACCT	GCACAGAAGCTGCGGAAT	56
<b>Lot 3 B</b>	GGCTTTCAAGGAAATCCATACCT	GCACAGAAGCTGCGGAAT	56
<b>Lot 4</b>	GCTATGATGGCAATCCGTATCTT	CCACTCAAGAGCTCTGCAAGAA	57
<b>Lot 5 A</b>	GATTCACAGGAAACCCCTATCT	CCTAATAGCTTGACCACATTCTTG	54
<b>Lot 5 B</b>	GGTTCGAAGGAAATCCCTATCT	CGCAAGGGCAATCTCTGAT	55
	GGTTCGAAGGAAACCCCTATCT	CCAAGTAGCCTAACACATTCTG	
<b>Lot 5 C</b>	GGTTCGAAGGAAATCCTTATCT	CCGAAGCTCCAAAATCTGCT	55
	GGTTCGAAGGAAACCCCTATCT	CCAAGTAGCCTGACTATATTCTT	
	GGTTCGAAGGAAACCCATATCT		
	GATTCGAAGGAAATCCCTATCT		
	GATTCGAAGGAAACCCATATCT		
<b>Lot 6 A</b>	GTTACGAGGGCAAACCTTACCT	CTCGGTGATAAATCGGGATA	53
	GTTACGAGGGCAAACCTTACCT		
	GATTTGAGGGCAAACCTTACCT		
<b>Lot 6 B</b>	GCTATGAGGGCATCCCTTACCT	CCAAGCAACAACCGAGCA	56
<b>Lot 7</b>	GGRCTAATTGGTGATGGATATCTT	CGAACAGGCCAGTCAAGTC	56

**Tableau 1. Amorces utilisées pour le clonage des WAKs chez *Populus tremula x alba***

Des mélanges de différentes amorces sens et/ou antisens ont été réalisés pour les lots 5B, 5C et 6A. A : Adénine, T : Thymine, G : Guanine, C : Cytosine, R : G ou A, W : A ou T.

Expectation Maximization for Motif Elicitation, <http://meme.sdsc.edu/meme/cgi-bin/meme.cgi>; Bailey *et al.*, 2009).

### 3.3. Alignement multiple de séquences et analyse phylogénétique

L'alignement des séquences protéiques *PtWAKs* est conduit à l'aide du programme MUSCLE. Une phylogénie a été conduite exclusivement sur les domaines kinase complets, ce qui concerne un ensemble de 67 *PtWAKs*. L'analyse phylogénétique est menée *via* le site Phylogeny (<http://www.phylogeny.fr/>) en utilisant les paramètres par défaut suivant : alignement type MUSCLE, curation de contenu par G-Blocks, Phylogénie type Phy-ML et dessin de l'arbre par TreeDyn. L'efficacité des degrés de support pour chaque branche est appréciée par un nombre de bootstrap de 500. Seules les valeurs de bootstrap  $\geq 50\%$  sont reportées sur l'arbre.

### 3.4. Matériel végétal et conditions de culture

Le matériel végétal utilisé est le peuplier hybride *Populus tremula x alba*, clone INRA '717-1B4'. Les plantes sont issues de culture *in vitro* sur milieu de Murashige et Skoog (Murashige et Skoog, 1962). Après multiplication végétative, les plantules sont acclimatées en hydroponie (Morizet et Mingeau, 1976) en chambre de culture (16 h jour / 8 h nuit –  $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  –  $22^{\circ}\text{C} / 19^{\circ}\text{C}$  (jour / nuit) – 70% d'humidité relative). Dès que les plantes atteignent 20 cm de hauteur (*i.e.* 14 entrenœuds), elles sont transférées sur un autre système hydroponique permettant de poursuivre leur croissance jusqu'à une hauteur de 70 cm (43 entrenœuds). Les conditions de culture restent inchangées. Différents organes [apex, tige en croissance (entrenœud 38), pétiole en croissance (entrenœud 38), limbe en croissance (entrenœud 38), pétiole mature (entrenœud 10), limbe mature (entrenœud 10) et bourgeons] et différents tissus [écorce mature (entrenœud 10), xylème mature (entrenœud 10)] sont prélevés et immédiatement congelés dans l'azote liquide puis stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Simultanément, un lot de plantes cultivées en hydroponie ayant atteint 20 cm de hauteur sont repiquées en pots de 5 L contenant un mélange de sols commerciaux (50% Monagri<sup>®</sup> NF U 44-551, 50% Humustar, Champeix, France) complété d'une solution d'engrais  $1 \text{ g.L}^{-1}$  AlgoSpeed<sup>®</sup> (Algochimie, Château-Renault, France) contenant les minéraux N : P : K : Mg dans les proportions respectives de 17 : 7 : 22 : 3. Les pots sont placés en serre dans les conditions suivantes : 16 h jour / 8 h nuit,  $22^{\circ}\text{C} / 19^{\circ}\text{C}$  (jour / nuit),  $350 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  et  $70\% \pm 10\%$  d'humidité relative. Les plantes ont été arrosées chaque jour par remplissage des coupelles au pied des pots.

<b>Numéro du lot de PtaWAK</b>	<b>Nom des WAKs</b>
<b>Lot 1</b>	Poptr_0003s18440.1 / Poptr_0003s18480.1 / Poptr_0075s00210.1 / Poptr_0112s00230.1
<b>Lot 2A</b>	Poptr_0018s14510.1
<b>Lot 2B</b>	Poptr_0018s14500.1 / Poptr_0126s00200.1 / Poptr_0126s00230.1
<b>Lot 3A</b>	Poptr_0002s07650.1 / Poptr_0002s07660.1
<b>Lot 3B</b>	Poptr_0002s07670.1
<b>Lot 4</b>	Poptr_0001s03190.1 / Poptr_0001s03210.1 / Poptr_0001s07540.1 / Poptr_0001s07550.1 / Poptr_0001s07620.1 / Poptr_1809s00200.1
<b>Lot 5A</b>	Poptr_0004s20290.1
<b>Lot 5B</b>	Poptr_0004s20300.1 / Poptr_0004s20330.1 / Poptr_0004s20350.1 / Poptr_0103s00200.1
<b>Lot 5C</b>	Poptr_0004s20340.1 / Poptr_0004s20360.1 / Poptr_0004s20380.1 / Poptr_0004s20400.1 / Poptr_0009s15610.1 / Poptr_0009s15650.1 / Poptr_0009s15690.1 / Poptr_0103s00220.1 / Poptr_0273s00200.1
<b>Lot 6A</b>	Poptr_0003s18410.1 / Poptr_0003s18500.1 / Poptr_0075s00220.1
<b>Lot 6B</b>	Poptr_0001s03240.1 / Poptr_0001s07650.1
<b>Lot 7</b>	Poptr_0002s13210.1 / Poptr_0014s03810.1

**Tableau 2. Liste des 38 WAKs potentiellement amplifiées chez *Populus trichocarpa* par les amorces du tableau 1**

La nomenclature utilisée est celle de la version v2.0 utilisée sur phytozome (<http://www.phytozome.fr/>; Annexe 1).

Les plantes ayant atteint 70 cm de hauteur (43 entre-nœuds) et présentant une tige rectiligne sont sélectionnées pour les stimulations gravitropiques. Elles sont préalablement tutorées 2 semaines avant le début de l'expérience. Les stimulations sont assurées par inclinaison de 35° par rapport à l'axe vertical naturel à l'aide d'un support calibré sous les pots (Figure 11). Cet angle permet une réponse gravitropique des tiges en évitant tout développement de branches latérales. La partie basale des tiges (entre-nœuds 1 à 5) est collectée après 30 min, 1 h et 2 h d'inclinaison. Les parties supérieure et inférieure sont alors séparées à l'aide d'un scalpel. Pour chaque partie, le xylème et l'écorce sont séparés manuellement. Ces différents tissus sont congelés individuellement et immédiatement dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C.

### 3.5. Extraction ADNg, ARNs, synthèse des ADNc

Les ARN totaux (ARNtx) ont été extraits à partir de 150 mg de broyat d'organes ou de tissus végétal en utilisant un tampon d'extraction au CTAB (cetyltriméthylammonium bromide) selon le protocole décrit par Chang *et al.*, 1993. La concentration et la qualité des ARNtx sont déterminées par dosage spectrophotométrique aux longueurs d'onde 260 nm et 280 nm à l'aide d'un Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), ainsi que par dépôt d'1 µg d'ARNtx sur un gel TAE 0,5X - agarose 1,5%. La synthèse d'ADNc simple brin est réalisée à partir d'1 µg d'ARNtx avec le kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en respectant le protocole du fabricant.

Les ADN génomiques (ADNg) sont extraits à partir de 150 mg de limbe mature de peuplier en utilisant un tampon d'extraction au CTAB d'après le protocole de Novaes *et al.*, 2009. La quantité et la qualité de l'ADNg extrait sont évaluées par spectrophotométrie à 260 nm et 280 nm (NanoDrop ND-1000) et par migration sur un gel TAE 0,5X – agarose 1%.

### 3.6. Clonage des WAKs

Dans ce travail exploratoire, nous avons ciblé préférentiellement les WAKs de type RLK comportant les domaines GubWAK, WAK et EGF.

Pour ce faire, le clonage des WAKs chez l'hybride *Populus tremula x alba* (*PtaWAKs*) est réalisé sur des amplifiats PCR obtenus avec l'aide de plusieurs couples d'amorces (Tableau 1) dessinés après alignement nucléotidique des séquences codantes prédites *Populus trichocarpa* (*PtWAKs*) grâce au logiciel Primer3plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>, Untergasser *et al.*, 2007). Ces amorces ciblent spécifiquement 2 zones consensus : l'amorce dite sens le domaine extracellulaire et l'amorce antisens le domaine kinase. Tenant compte du degré de polymorphisme entre les différentes

Nom	Séquence sens (5'-3')	Séquence antisens (5'-3')	Tm °C	Taille ADNc (pb)
Pta1	TTACTAGTTTATGAATATGTTGCAAAC	CCAGGTGAGGGCCGACACCTTA	63	81
Pta2	GTTGGAGCAGCAGCTATCAAGAC	CACCTCATTGATAAACTGCTCGATT	56	229
Pta3	GGAGTTCTAGCAGATGATGTCC	CGTCTTGTGATTGACCTGTGAG	57	126
Pta4	CAACCAACAATTATGCTGATGATCG	ACTTCTTGACAGCAACCAT	53	102
Pta5	AGTTGCTGTCAAGAAGTCCAAG	TCCAAGCACAGGCCAGGAGT	62	126
Pta6	GAAGCTGCAGATATCAGCATTCCC	GTCTCTATGTTTATCCTCTTAATG	53	168
Pta7	CATTACAATGTGAATAGAACGCTG	TCTATGGTTAATTTGGGATAGAAG	54	168
Pta8	CTTTCAACGGAATGGTGGTTTG	ATTGTCTGAGATTATCTTCATCAAGA	53	236
Pta9	GTTGCTGCTTGTGGTATTTGGC	CCATCACTTGAGGATAATTGCTGC	57	129
Pta10	GTCGCTGCTGAAACCGCTAAC	GATAGCCTGGAGTTCCTTGCGGT	61	199
Pta11	TCTTGGATTCGATAAGGATATCGC	CTTCTGCATTCCCTGCTCCATAG	58	167
Pta12	TCAGTTCCTATAATCCGTAGTG	CGTCGAGCTCGGGACCGTGC	62	223
Pta13	GAAGTGAATTTGGCTTCTCTTGCT	AACCTCCATCATTGAAGGCCTGG	58	183
Pta14	CCACTCATTTTCTTCTTTGATGGT	AGCATCTTCTGCAAGAATAGCC	58	121
Pta15	GGGCTGCAACAATCGTGCTTTA	ACTTCGGACCAGATCTTGGCTAT	58	169
Pta16	CTAATTATGGCGAAGCCTAATTGTAA	TCGAACCGTATGATAACCGTACC	57	210
Pta17	AGGTTGTGAAACTGTCTCCATA	CTCCAAGTAGCAACCCTTTCCG	58	167
Pta18	ATTTTCTCTAGAAGCATCAAATCGG	TCAAGAACTGCTCAAGCCTCTTAT	56	247
Pta19	GAGCTGCTTGAGGTTAAATGGGG	CATATTCATTCTTGTTCGACGG	55	113
Pta20	CTATTATCACGTAACGGTATCAATAC	GGGGGGACCACAACAATTAC	58	247
Pta21	GAATGCAAGTCTCCAATGGATG	CTATCTGACTTATTGAATGTTGGAAG	53	122
Pta22	TTAAAAAACCTTGTAAGAAGGTATT	ACCATTACCACCTCTTGACAAC	57	117
Pta23	AAAAACGCTTGTAAGAAGGTACC	CCTGGTATCATCACAATTATTGCAG	55	127
Pta24	CTAATGTTTTTAAACATTTACGACAGAC	TTTTACCATCACCGTACTTGCCAA	57	139
Pta25	GAGGGGATCCAAAAGTCATACGT	CTATCCGAAATAGAGCCTGTTGT	55	168
Pta26	GAGACAGAGCATTGTAGGAAAAT	GGTTAAAGACCGCATTGGTTCA	58	155

**Tableau 3. Amorces utilisées pour l'amplification des WAKs chez *Populus tremula x alba* par qPCR**

isoformes de WAK, ces amorces sont réparties en 12 lots, chacun amplifiant potentiellement une ou plusieurs *WAK(s)* chez *P.trichocarpa* (tableau 2). Les amplifications PCR sont réalisées avec un thermocycleur MyCycler™ (BioRad, Hercules, CA, USA) dans un volume réactionnel de 30 µL en utilisant 2 µL d'un mélange d'ADNc dilué au 40<sup>ème</sup> provenant des différents organes et tissus de 4 plantes, ou 100 ng d'ADNg, et 0,2 µL d'Advantage® 2 Taq Polymerase (Clontech, Mountain View, CA, USA). Le programme utilisé est le suivant :

- Dénaturation initiale : 1 min à 95°C
- 35 cycles de 30 sec à 95°C, 30 sec à X°C (Tableau 1), 3 min à 68°C
- Elongation terminale : 3 min à 68°C

Les fragments amplifiés chez *Populus tremula x alba* sont ensuite insérés dans le vecteur plasmidique pGEM®-T Easy (Promega, Fitchburg, WI, USA) puis multipliés à l'aide de bactéries thermocompétentes *Escherichia coli* (souche JM109). La présence d'insert a été vérifiée par amplification PCR sur colonies blanches avec les amorces universelles SP6 et T7 puis par électrophorèse sur gel TAE 0,5X - agarose 1,5%. Les clones positifs ont été séquencés à partir des amorces SP6 et T7 (Beckman Coulter Genomics, Danvers, MA, USA).

### 3.7. PCR quantitative en temps réel

Les amorces de PCR quantitative (Tableau 3) sont dessinées à partir des séquences des clones obtenus précédemment et des séquences ESTs de *Populus tremula x alba*, *Populus tremula* et *Populus alba* présentes dans les bases de données NCBI. Elles furent validées par PCR classique sur les matrices d'ADN génomique et d'ADNc de *Populus tremula x alba*. Si aucune amplification n'est observable, les amorces sont rejetées. Pour chaque couple d'amorce offrant un signal d'amplification positif, la température optimale d'hybridation est déterminée lors d'une PCR en gradient de température (gamme de 50 °C à 65 °C). Les températures optimales sont présentées dans le tableau 3. De même, l'efficacité des amplifications (E) est appréciée au cours d'une PCR sur une dilution d'ADNc présentant une gamme de dilution au demi allant du 20<sup>ème</sup> au 160<sup>ème</sup>. Les efficacités sont toutes comprises entre 94% et 107%.

Les PCR en temps réel sont réalisées à l'aide du thermocycleur iCycleur iQ (BioRad, Hercules, CA, USA) dans un volume réactionnel de 20 µL en utilisant 2 µL d'un mix d'ADNc de 4 plantes dilués au 40<sup>ème</sup> et 10 µL de MESA GREEN qPCR MasterMix Plus (Eurogentec, Seraing, Belgique). Le programme utilisé est le suivant :

- Dénaturation initiale : 3 min à 94°C
- 40 cycles de 15 sec à 94°C, 15 sec à X°C (Tableau 3), 20 sec à 72°C

Groupe	Caractéristiques	Nombre de gènes
<b><i>Pt</i>WAK-RLK (Receptor-like kinase)</b>	Présente à la fois le domaine kinase intracellulaire et un ou plusieurs domaine(s) extracellulaire(s) (GubWAK, WAK, WAKassoc ou EGF)	68
<b><i>Pt</i>WAK-RLCK (Receptor-like cytoplasmic kinase)</b>	Présente le domaine intracellulaire kinase (absence de domaines extracellulaires)	21
<b><i>Pt</i>WAK-RLP (Receptor-like Protein)</b>	Présente au moins deux domaines extracellulaires (GubWAK, WAK, WAKassoc ou EGF ; absence du domaine intracellulaire)	18
<b><i>Pt</i>WAK (gènes courts)</b>	Ne présente qu'un seul domaine extracellulaire (GubWAK, WAK, WAKassoc ou EGF) ou aucun domaine identifiable mais présente au moins 40 % de similarité avec un membre de la famille <i>Pt</i> WAKs	13

**Tableau 4. Classification des WAKs en fonction de la nature de leur domaine fonctionnel**

- Elongation terminale : 5 min à 72°C
- Dissociation des produits PCR de 55°C à 95°C par intervalle de 0,5°C toutes les 10 sec.

Les profils graphiques obtenus lors de cette dernière étape permettent de s'assurer du bon déroulement de la réaction d'amplification PCR. Trois réplicats techniques sont réalisés par échantillon.

Les niveaux d'expression constitutifs des transcrits de différents gènes *WAK* sont estimés dans les tissus et organes décrits précédemment. Les cycles seuils ( $C_q$ ) bruts sont dans un premier temps normalisés par 3 gènes de références (*ACT1*, *UPI* et *UP2*) sélectionnés parmi un pool de 9 candidats à l'aide de l'outil BestKeeper (<http://www.wzw.tum.de/gene-quantification/bestkeeper.html> ; Pfaffl *et al.*, 2004). Les valeurs corrigées  $C_{q_c}$  sont dans un second temps exprimées en unités arbitraires à partir de l'équation : Valeur =  $-0,0909 \times C_{q_c} + 3,5455$ . Cette formule correspond à l'équation d'une droite étalon qui associe le  $C_{q_c}$  le plus précoce (cycle 28 ; c'est-à-dire la *WAK* la plus exprimée) à la valeur 1 et au  $C_{q_c}$  le plus tardif (cycle 39 ; considéré comme limite de non expression) à la valeur 0 (Lopez *et al.*, 2012). Les données sont analysées statistiquement à l'aide d'une ANOVA, suivi d'un test LSD (Least Significant Difference) de Fisher ( $\alpha = 5\%$ ).

Les niveaux d'expression modulés différenciellement des transcrits des gènes *WAKs* sont estimés après 30 min, 1 h et 2 h d'une stimulation gravitropique. Les cycles seuils  $C_q$  bruts sont normalisés en utilisant les 3 gènes de références *TIP41-like*, *UPI* et *UP2* sélectionnés comme précédemment. Les niveaux d'expression pour chaque échantillon sont calculés en utilisant la méthode  $(1+E)^{-\Delta\Delta C_q}$  (Livak et Schmittgen, 2001). Les données sont analysées à l'aide d'une ANOVA, suivi d'un test LSD de Fisher ( $\alpha = 5\%$ ).

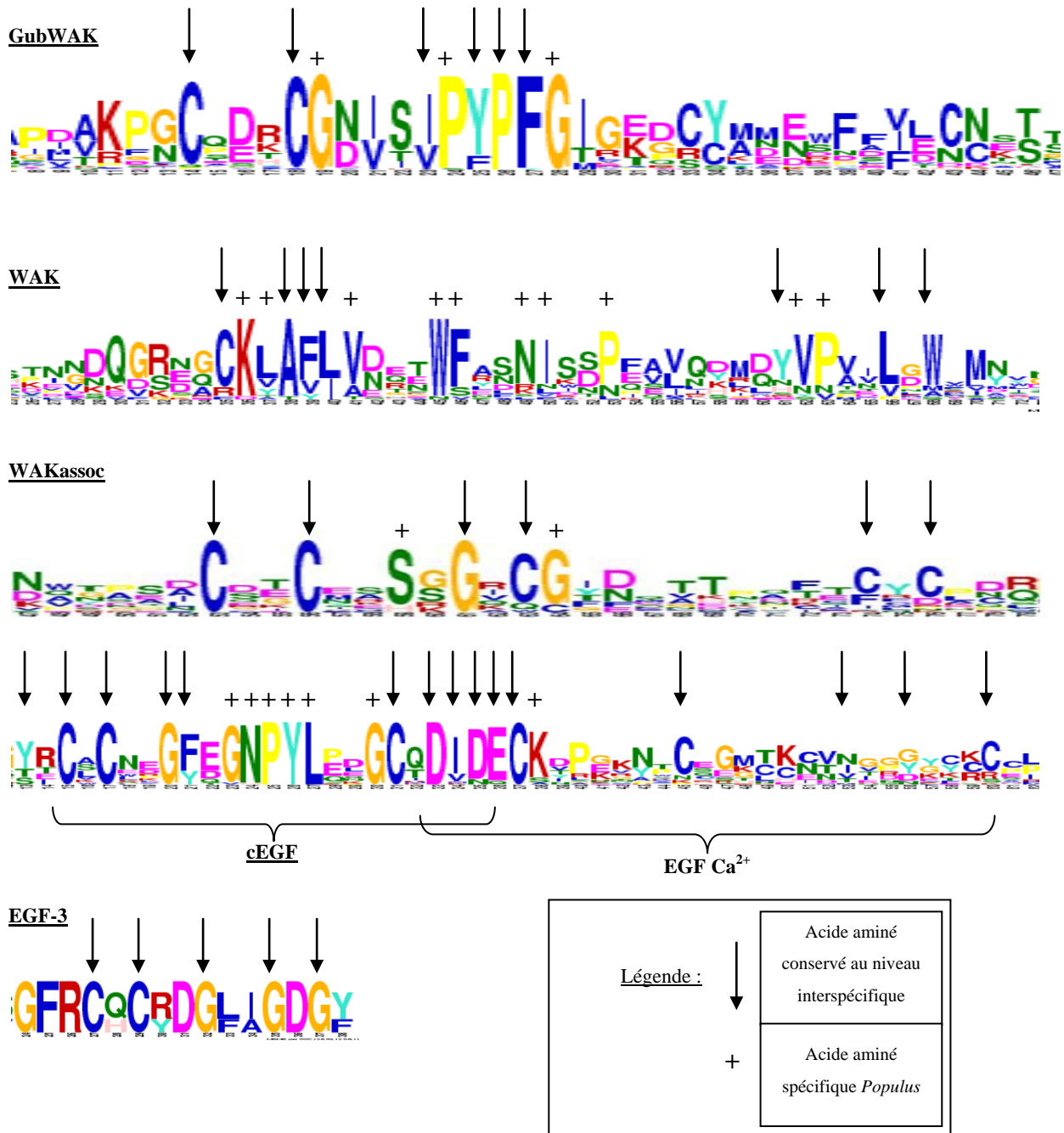
## 4. RESULTATS

### 4.1. Analyses bioinformatiques des *WAKs* du génome de *Populus trichocarpa*

L'étude des bases de données génomiques dans Phytozome et d'ESTs dans NCBI nous permet d'identifier 120 séquences génomiques qui correspondent à des *WAKs* chez *P. trichocarpa*. Nous leur attribuons la nomenclature concise en vigueur chez *Populus*, *PtWAKs* à l'instar de celle existante chez *Arabidopsis* (*AtWAKs*) ou le riz (*OsWAKs*). Elle accompagne la nomenclature officielle générée lors de la dernière annotation du génome de *Populus trichocarpa* (JGI version 2.0) définie ainsi : Poptr\_XXsYYYYY.1 pour *Populus trichocarpa*\_groupe de liaison s position du gène.nombre d'allèles.

Lors de la première étape du travail d'extraction des *PtWAKs* par les procédures successives de BLASTp (avec comme requête les 5 *AtWAKs*), et BLASTn (avec comme requête les





**Figure 12. Caractérisation des différents domaines des WAKs**

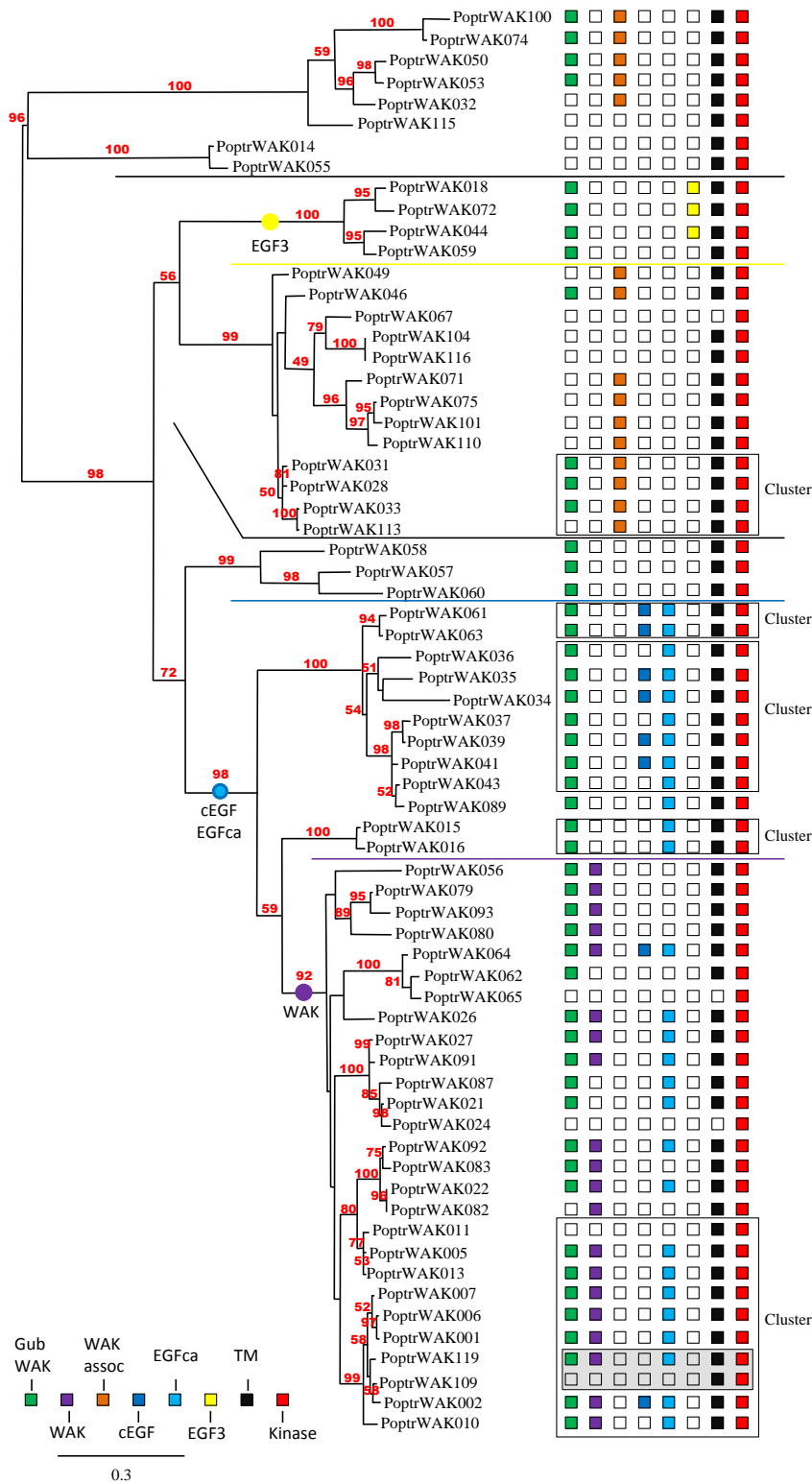
La représentation des acides aminés conservés entre les différentes séquences WAKs de peuplier montre ceux conservés au niveau inter-espèces selon la base de données PFAM (« ↓ ») ainsi que les acides aminés qui semblent spécifiques au peuplier (« + »). Les domaines EGF-Ca<sup>2+</sup> et EGF-3 sont plus courts que ceux décrits dans les bases de données (3 et 2 cystéines au lieu de 6 pour EGF-Ca<sup>2+</sup> et EGF-3, respectivement). A : Alanine, C : Cystéine, D : Acide aspartique, E : Acide glutamique, F : Phénylalanine, G : Glycine, H : Histidine, I : isoleucine, K : Lysine, L : Leucine, M : Méthionine, N : Asparagine, P : Proline, Q : Glutamine, R : Arginine, S : Sérine, T : Thréonine, V : Valine, W : Tryptophane, Y : Tyrosine,

*PtWAKs* nouvellement identifiées), 220 séquences ont été collectées. Sur ces 220 séquences, seules 114 s'avèrent être des WAKs. Les 106 séquences rejetées, bien qu'étant des protéines kinases, appartiennent aux familles des récepteurs PERKs (Proline extension rich kinase) et LRR (Leucine rich repeat). Pour s'assurer d'une collecte exhaustive des membres de la famille des *PtWAKs*, une seconde recherche BLASTn ciblée sur l'existence des ESTs dans les banques de données a été conduite. Cette recherche a permis d'identifier 19 ESTs *Populus trichocarpa*, représentatifs de 9 WAKs. De plus, 37 ESTs *Populus tremula x alba*, *Populus tremula* et *Populus alba* représentatifs de 21 WAKs ont été extraits. Un EST issu de banque *P.trichocarpa*, CV242354.1 (Annexe 2), présente une homologie d'au mieux 90% avec certains membres des 114 *PtWAKs*. Cela laisse sous-entendre l'existence d'autres membres WAKs dans des régions du génome de peuplier non/mal annotées. Un BLASTn utilisant comme requête cet EST sur Phytozome a permis l'identification d'un nouveau membre, annoté kinase, qui s'avère être une WAK (*PtWAK28*). L'analyse des régions génomiques de part et d'autre de ce gène a permis l'identification de 5 autres membres (*PtWAK29* à *PtWAK33*).

Le génome du peuplier est constitué de 19 chromosomes. Sur les 120 *PtWAKs*, 81 sont localisées sur 14 chromosomes. A l'exception de 5 *PtWAKs* (14 – 18 – 44 - 57 et 60), elles se répartissent en « clusters » de 2 à 9 gènes. Les 39 *PtWAKs* restantes sont localisées sur 18 groupes de liaison indépendants (Annexe 1).

L'analyse des séquences protéiques montre l'existence de différents domaines répartis de part et d'autre d'un domaine transmembranaire : 1 domaine sérine/thréonine kinase intracellulaire puis 4 domaines GubWAK, WAK, WAKassoc et EGFs extracellulaires. L'ensemble de ces 5 domaines n'est rencontré sur aucune *PtWAK*. Ainsi, en fonction de la présence/absence de ces domaines, les protéines peuvent être classées en 4 groupes adaptés d'un précédent travail chez le riz (Zhang *et al.*, 2005 ; Tableau 4) :

- *PtWAK-RLK* pour Receptor-like kinase, avec 68 membres qui présentent à la fois le domaine kinase intracellulaire ainsi qu'un ou plusieurs domaine(s) extracellulaire(s).
- *PtWAK-RLCK* pour Receptor-like cytoplasmic kinase, avec 21 membres qui présentent uniquement le domaine kinase intracellulaire.
- *PtWAK-RLP* pour Receptor-like protein, avec 18 membres qui présentent au moins 2 domaines extracellulaires selon de multiples combinaisons possibles.
- *PtWAK-gènes courts* avec 13 membres d'une taille maximale de 250 acides aminés n'affichant qu'un seul domaine ou aucun identifiable, mais qui montrent au moins 40% de similarité avec un membre de la famille *PtWAKs*.



**Figure 13. Analyse phylogénétique à partir du domaine kinase de 67 WAKs de peuplier**  
 Les couleurs représentent les différents domaines indiqués dans la légende. Les cadres montrent les groupes monophylétiques où sont réunis les gènes présents en cluster génomique. Les nœuds représentatifs des groupes phylétiques où se situent les différents domaines sont indiqués par un cercle de couleur. Les chiffres indiquent les scores obtenus suite à 500 bootstraps.

#### 4.2. Caractérisation des domaines

L'analyse des différents domaines des protéines *PtWAK* permet de mettre en évidence des acides aminés conservés entre les différentes protéines. (Figure 12, « ↓ » et « + »). Les acides aminés notés « ↓ » sont conservés au niveau « inter-espèce » selon la description de la base de données PFAM. Les acides aminés supplémentaires indiqués par un « + » sont spécifiques de l'espèce *Populus trichocarpa*. Sur l'ensemble des domaines identifiés, il est intéressant de noter que les domaines EGF-Ca<sup>2+</sup> et EGF-3 se singularisent chez *Populus*. En effet, ces domaines sont plus courts avec respectivement 3 et 2 cystéines alors qu'ils sont communément présentés avec 6 cystéines conservées.

#### 4.3. Analyse phylogénétique des WAKs chez *Populus trichocarpa*

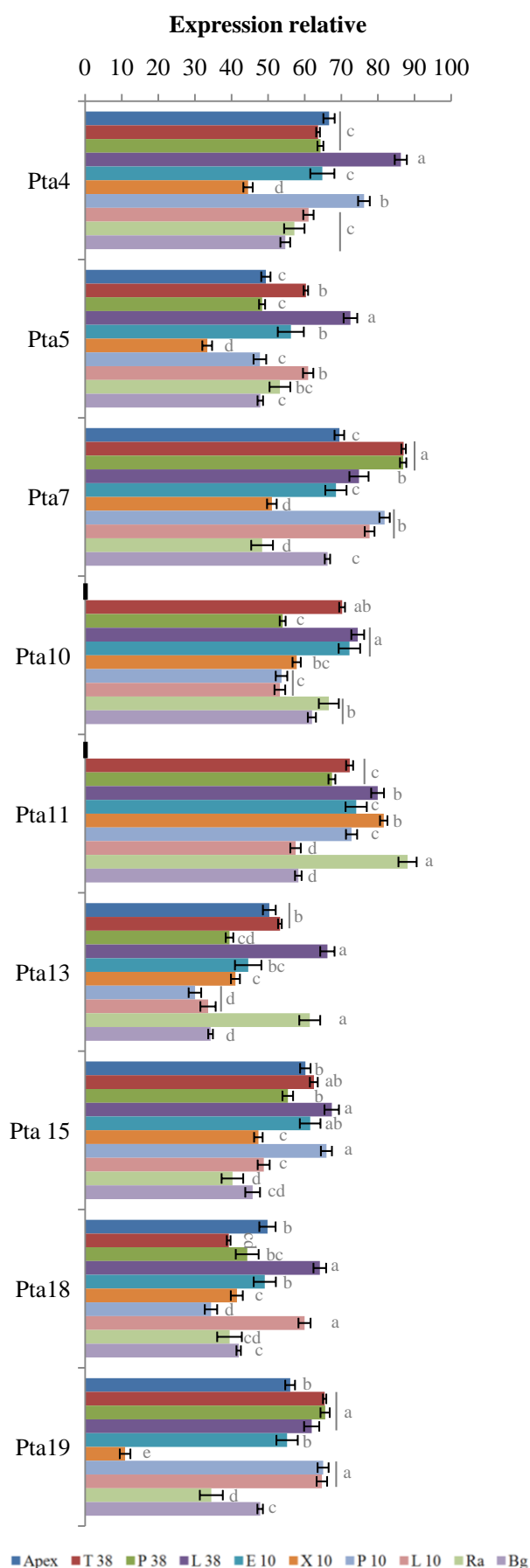
L'analyse phylogénétique a été conduite en ciblant exclusivement le domaine kinase des *PtWAKs* appartenant aux groupes *PtWAK-RLK* et *PtWAK-RLCK*. Du fait des limites des algorithmes utilisés pour les analyses phylogénétiques, 22 séquences incomplètes ont été exclues. Ainsi, cette phylogénie a été conduite sur les 67 membres qui présentaient un domaine kinase intégral (Figure 13). De manière très intéressante, cette phylogénie permet de regrouper les différents domaines WAK, EGF-Ca<sup>2+</sup>, cEGF et EGF-3 au sein de groupes monophylétiques distincts. De plus, les *WAKs* localisées au sein d'un même « cluster » sont également regroupées au niveau phylogénétique. Seul le domaine GubWAK, domaine de liaison aux pectines, est réparti de manière aléatoire sur l'ensemble de la phylogénie.

#### 4.4. Clonage des *WAKs Populus tremula x alba*

Notre modèle d'étude expérimental est le peuplier hybride *Populus tremula x alba*. Son génome n'est pas séquencé. Par conséquent, nous nous sommes appuyés sur les banques d'ESTs (NCBI) *P. tremula x alba* pour récupérer des séquences *PtaWAKs* en utilisant l'ensemble des *PtWAKs* comme requête. Cinq séquences ESTs *PtaWAKs* ont été identifiées et correspondraient à 4 unigènes. De même cette recherche fut étendue sur les espèces apparentées *P. tremula* et *P. alba*, générant respectivement 31 et 1 ESTs correspondant à 17 unigènes. Raisonnablement, les séquences ESTs identifiées ne permettent pas de spécifier avec exactitude les isoformes correspondantes chez *P. trichocarpa*. En effet, ces ESTs se situent dans des régions kinase très conservées mais présentent au mieux des homologies moyennes avec leurs orthologues putatifs de 94%. Ce niveau significatif de polymorphisme non attendu rend délicat le dessin de couples d'amorces spécifiques de chaque isoforme *PtWAK* utilisables sur l'hybride *P. tremula x alba*. Nous avons alors choisi d'utiliser des amorces non spécifiques dessinées dans les régions conservées WAK/EGF et kinase des

**Figure 14. Niveaux d'expression de WAKs chez un peuplier *Populus tremula x alba* âgé de 3 mois**

Les amplifications ont été réalisées sur des ADNc dilués au 1/40 de 4 plantes. L'expression relative obtenue (section « Matériels et méthodes ») correspond à la moyenne de 3 répétitions techniques  $\pm$  l'erreur standard. Les données ont été analysées à l'aide d'une ANOVA suivie d'un test LSD de Fisher ( $\alpha = 5\%$ ). Les traits noirs sur l'axe des abscisses indiquent qu'aucune expression n'est détectée. T : Tige, P : Pétiole, L : Limbe, E : Ecorce, X : Xylème, Ra : Racine, Bg : Bourgeons. La numérotation des organes se fait en fonction de l'entrecœud de prélèvement (Matériels et méthodes).



*PtWAK-RLK* de *Populus trichocarpa* (Tableaux 1 et 2), et d'employer des matrices nucléotidiques de *P. tremula x alba* (ADNg et mix d'ADNc de différents organes). Après clonage puis séquençage, 12 isoformes *PtaWAKs* furent identifiées.

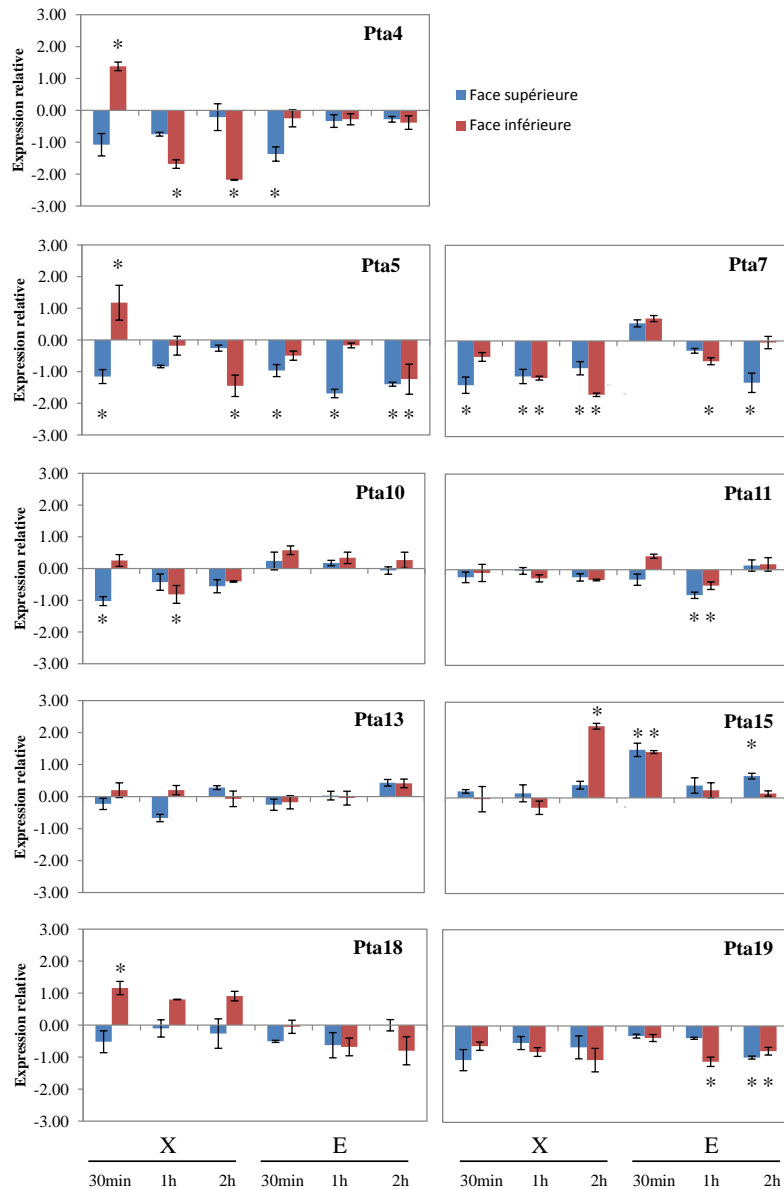
Cet ensemble de séquences *PtaWAKs* collectées dans NCBI et par clonage a permis le dessin de couples d'amorces spécifiques à l'espèce *P. tremula x alba*, avec pour objectif d'apprécier fidèlement les niveaux d'expression constitutifs et modulés des gènes correspondant.

Nous attirons l'attention sur le fait que la nomenclature des séquences *PtaWAKs* (*PtaWAK1* à *PtaWAK26*) employée dans ce rapport est arbitraire. Elle correspond à l'ordre de collecte des séquences. Cette collecte sera à nouveau entreprise sur *P. tremula x alba* pour (i) enrichir notre base *PtaWAK* et (ii) obtenir les séquences dans leur pleine longueur. Ensuite seulement, une nomenclature officielle des séquences *PtaWAKs* calée sur celle des homologues *PtWAKs* sera appliquée et soumise pour enregistrement dans les bases de données génomiques NCBI.

#### 4.5. Etude de l'expression des WAKs chez *Populus tremula x alba*

Sur les 26 *PtaWAKs* identifiées, seules 9 donnent un signal d'expression dans les tissus du xylème et de l'écorce. Par conséquent, nous avons opté pour le suivi exclusif de ces neuf WAKs dans différents organes végétatifs afin d'apprécier leurs niveaux d'expression constitutifs, puis dans les tissus de la tige soumise à une stimulation gravitropique afin de suivre d'éventuelles modulations contrastées dans leur expression.

Au niveau constitutif, à l'exception de *PtaWAK10* et *PtaWAK11* non exprimés dans l'apex de la plante, les 9 isoformes sont exprimées ubiquitairement dans tous les organes et tissus avec des niveaux d'accumulation contrastés (Figure 14). De façon générale, une expression plus importante dans les limbes en croissance (*PtaWAK4*, *PtaWAK5*, *PtaWAK10*, *PtaWAK13*, *PtaWAK15* et *PtaWAK18*) et plus faible dans le xylème mature (*PtaWAK4*, *PtaWAK5*, *PtaWAK7*, *PtaWAK10* et *PtaWAK19*) semble se dégager. Les différentes isoformes présentent entre elles des profils d'expression différentiels, hormis *PtaWAK7* et *PtaWAK19* dont les profils d'expression offrent des tendances similaires. Dans le détail, *PtaWAK4* est plus exprimé dans les limbes jeunes et les pétioles matures et faiblement dans le xylème mature. *PtaWAK5* est plus exprimé que dans les limbes jeunes et moins exprimé dans le xylème mature. *PtaWAK7* et *PtaWAK19* montrent des expressions préférentielles dans les tiges et pétioles jeunes. *PtaWAK11* est plus exprimé dans les racines. Le gène *PtaWAK13* présente une expression plus importante dans les limbes jeunes et les racines. *PtaWAK18* est faiblement exprimé, mais présente une expression relativement plus forte dans les feuilles.



**Figure 15. Etude de l'expression relative de 9 WAKs chez *Populus tremula x alba* après un stimulus gravitropique**

Les plantes sont inclinées à 35° pendant 30 min, 1 h et 2 h. Les demi-cylindres supérieur (bleu) et inférieur (rouge) de la tige sont séparés. Pour chaque partie, le xylème (X) et l'écorce (E) sont individualisés. Les amplifications PCR sont réalisées à partir d'un pool d'ADNc dilués au 40<sup>ème</sup> provenant de 4 plantes. L'expression relative de 9 *PtaWAKs* est calculée en fonction de l'expression dans les plantes non inclinées, d'après la formule  $(1+E)^{-\Delta\Delta Cq}$ . Les valeurs observées correspondent à la moyenne de 3 répétitions techniques  $\pm$  l'erreur standard. Les données du xylème et de l'écorce sont analysées séparément à l'aide d'une ANOVA suivi d'un test LSD de Fisher ( $\alpha = 5\%$ ). Les niveaux d'expression significativement différents du témoin dans le xylème ou dans l'écorce sont indiqués par le symbole '\*'.

Enfin, les gènes *PtaWAK10* et *PtaWAK15* présentent un profil d'expression plutôt homogène entre les différents tissus et organes étudiés.

Dans des plantes soumises à des contraintes gravitropiques, l'expression des 9 *PtaWAKs* a ensuite été analysée dans le xylème et l'écorce des demi tiges supérieure et inférieure après 30 min, 1 h et 2 h suite à une inclinaison de 35°, et comparée aux plantes témoins non inclinées (Figure 15). Huit *PtaWAKs* montrent des cinétiques d'expression significativement différentielles suite à la stimulation. De manière globale, aucun profil d'expression consensus n'est observable entre les WAKs, que ce soit dans le xylème ou l'écorce. Toutefois, à l'exception de *PtaWAK15* qui est surexprimé dans les différents, les autres gènes montrent plutôt des sous-expressions. Ces dernières sont soit transitoires (*PtaWAK10*, *PtaWAK11* et *PtaWAK19*) soit maintenues (*PtaWAK5* et *PtaWAK7*). De même, des modulations d'expression significativement contrastées sont observées dans le xylème entre les côtés supérieur et inférieur 30 min après inclinaison pour *PtaWAK4*, *PtaWAK5*, *PtaWAK7*, *PtaWAK10* et *PtaWAK18*.

Dans le détail, *PtaWAK5* et *PtaWAK10* sont réprimés transitoirement 30 min après l'inclinaison au niveau du xylème, face supérieure de la tige. *PtaWAK17* est également réprimée dès 30 min mais cette répression se maintient toujours 2 h après inclinaison. Face inférieure du xylème, il y a différents profils d'expression. *PtaWAK15* et *PtaWAK18* sont respectivement surexprimés 2 h et 30 min après inclinaison, tandis que *Pta10* est réprimée significativement 1 h après inclinaison. *PtaWAK4* et *PtaWAK5* montrent des surexpressions significatives par rapport au témoin dès 30 min après inclinaison, suivi de sous-expressions significatives 1 h et 2 h après inclinaison pour *PtaWAK4* et 2 h après inclinaison en ce qui concerne *PtaWAK5*. Enfin, *PtaWAK7* est réprimée de manière significative 1 h et 2 h après le début de l'inclinaison. En ce qui concerne l'écorce, face supérieure de la tige, l'expression de *PtaWAK4* est réprimée de manière significative 30 min après inclinaison, celle de *PtaWAK11* 1 h après inclinaison et celle de *PtaWAK7* et *PtaWAK19* 2 h après inclinaison. L'expression est également réprimée pour *PtaWAK5* à 30 min, 1 h et 2 h après inclinaison. L'expression de *PtaWAK15* est augmentée significativement par rapport au témoin, 30 min et 2 h après inclinaison. Face inférieure de la tige, les expressions de *PtaWAK7* et *PtaWAK11* sont significativement réprimées dans l'écorce 1 h après inclinaison, de *PtaWAK5* 2 h après inclinaison et de *PtaWAK19* au-delà d'1 h après inclinaison.





## 5. Discussion

### 5.1. Analyse *in silico* des WAKs chez *Populus trichocarpa*

La grande famille des kinases est composée de différentes sous-familles classées selon leur rôle biologique et leur structure (Stone et Walker, 1995). On distingue les protéines tyrosine kinase et les protéines sérine/thréonine kinase. Parmi les sérine/thréonine kinase, les Receptor-like kinase (RLK) sont composés d'une partie kinase intracellulaire conservée, d'un domaine transmembranaire et d'un ou plusieurs domaines extracellulaires variables qui déterminent la classe de ces protéines (Lehti-Shiu *et al.*, 2012). Les Wall-associated kinase (WAKs) sont classées parmi les RLK tout comme les Leucine-rich repeat protein (LRR) ou encore les Proline-rich extension kinase (PERK).

Notre étude des WAKs est la première réalisée chez un ligneux. Notre approche *in silico* permet l'identification de 120 *PtWAKs* putatives dans le génome de *P.trichocarpa*. La diversité de ces gènes au sein de cette espèce est comparable à celle trouvée chez le riz *O.sativa* avec 125 *OsWAKs* répertoriées (Zhang *et al.*, 2005).

Chez le riz, la classification de ces 125 *OsWAKs* est basée sur l'existence de deux domaines, l'EGF extracellulaire et le kinase intracellulaire. Ainsi chez cette espèce, nous distinguons les gènes *OsWAK-RLK* (Receptor-like kinase) qui codent des protéines possédant à la fois un domaine EGF et un domaine kinase, les gènes *OsWAK-RLP* (Receptor-like protein) qui codent des protéines qui ne présentent qu'un domaine EGF extracellulaire, et enfin les gènes *OsWAK-RLCK* (Receptor-like cytoplasmic kinase) qui codent des protéines présentant uniquement un domaine kinase intracellulaire (Zhang *et al.*, 2005). De plus ces auteurs ont aussi trouvé des protéines sans domaines ayant au moins 40% d'identité avec les *OsWAKs* décrites précédemment qu'ils ont qualifiées de WAKs « short-genes » (pour gènes courts). Cette définition des différents groupes de WAKs chez le riz n'est cependant pas adaptée aux *PtWAKs*. Alors que le génome du riz possède 80 séquences WAKs avec au moins un domaine EGF, seulement 41 protéines WAKs possèdent au moins un domaine EGF chez le peuplier. Les domaines EGF peuvent être de différents types : EGF-Ca<sup>2+</sup>, cEGF et EGF-3. De plus, notre analyse réalisée en s'appuyant sur les données PFAM (Punta *et al.*, 2012) nous permet d'identifier trois domaines extracellulaires supplémentaires dans les séquences WAKs de peuplier, qui n'avaient jamais été décrits sur ces protéines dans la littérature. Tenant compte des nomenclatures WAKs en vigueur et de la présence des domaines identifiés au cours de ce travail chez le peuplier, nous classons les *PtWAKs* dans 4 groupes (tableau 4) : *PtWAK-RLK* (68 membres), *PtWAK-RLCK* (21 membres), *PtWAK-RLP* (18 membres) et *PtWAK-gènes*



courts (13 membres). Toutefois, l'appartenance d'une WAK de peuplier à l'un ou l'autre de ces groupes dépend de la présence des domaines extracellulaires GubWAK, WAK, WAKassoc ou EGF ainsi que du domaine kinase. La discussion concernant la caractérisation des domaines extracellulaires est reportée au paragraphe suivant.

En comparaison à l'ensemble des 26 gènes d'*Arabidopsis thaliana* *AtWAK* / *AtWAK-like* (He *et al.*, 1999 ; Verica et He, 2002), cette famille multigénique est presque 5 fois plus importante en nombre d'éléments chez *Populus trichocarpa*. Contrairement à ce que supposait l'étude chez le riz (Zhang *et al.*, 2005), l'expansion de la famille multigénique WAK n'est donc pas spécifique aux monocotylédones. Ceci a déjà été rapporté dans la littérature pour une famille de protéines impliquées dans la résistance aux pathogènes (NBS-LRR pour Nucleotide Binding Site-Leucine-Rich repeat). En effet, une première étude montre que cette famille de protéines comporte ~ 600 membres chez le riz, soit 3 à 4 fois plus que le génome d'*Arabidopsis* (Bai *et al.*, 2002). Les auteurs avaient donc supposé des évolutions différentes entre monocotylédones et dicotylédones. Toutefois, une étude complémentaire montre que le génome de *Populus trichocarpa* possède environ 400 gènes codant des protéines de cette famille (Kohler *et al.*, 2008). Par conséquent, bien qu'il y ait une différence significative du nombre de gènes entre le peuplier et le riz, l'expansion de cette famille multigénique ne peut pas être due aux évolutions distinctes entre monocotylédones et dicotylédones.

Enfin, la structure génique observée pour les WAKs chez *A. thaliana* est conservée dans la plupart des cas pour les *WAK-like* chez *Arabidopsis thaliana* et les WAKs chez *Oryza sativa* (Verica et He, 2002 ; Zhang *et al.*, 2005). Cette structure consiste en 3 exons séparés par 2 introns, l'un en amont du domaine EGF, l'autre entre le domaine EGF et le domaine transmembranaire. Une structuration génomique similaire est retrouvée dans une majorité des *PtWAK-RLK* de peuplier.

## 5.2. Caractérisation des domaines protéiques

Les protéines *PtWAKs* de peuplier possèdent plusieurs domaines extracellulaires nommés GubWAK, WAK, WAKassoc et EGF (Figure 12).

Le domaine EGF est un domaine caractéristique des WAKs. Les *AtWAKs* présentent les domaines EGF-Ca<sup>2+</sup> et EGF-2 (Kanneganti et Gupta, 2008) tandis que les *PtWAKs* possèdent les domaines EGF-Ca<sup>2+</sup>, cEGF et EGF-3. Les domaines EGF sont supposés avoir un rôle dans l'interaction protéine-protéine (Stenflo *et al.*, 2000). Le domaine EGF-Ca<sup>2+</sup> en particulier requiert une interaction avec l'ion calcium Ca<sup>2+</sup> pour assurer ce type d'interaction protéine-protéine. Le domaine cEGF est facultativement associé au calcium et présente un site



d'hydroxylation sur une asparagine. Le domaine EGF-3 enfin, est un domaine EGF-like qui montre une forte similarité avec le domaine EGF mais qui ne s'associe pas au calcium (Stenflo *et al.*, 2000 ; Wouters *et al.*, 2005).

Le domaine GubWAK correspond à un domaine de liaison aux pectines (Decreux et Messiaen, 2005 ; Decreux *et al.*, 2006). Plusieurs travaux montrent que les protéines WAKs se lient aux pectines (He *et al.*, 1996 ; Wagner et Kohorn, 2001). Les domaines appelés WAK et WAKassoc n'ont quant à eux jamais été analysés d'un point de vue fonctionnel, et bien qu'apparaissant dans la base de données PFAM, ne font l'objet d'aucune description dans la littérature. D'après les bases de données, le domaine WAK est présent dans les protéines de type wall-associated kinase (donnée PFAM). Le domaine WAKassoc est quant à lui décrit comme un domaine riche en cystéines (5 cystéines conservées ; Figure 12) et positionné en aval du domaine GubWAK (donnée PFAM). Or, cette association n'est pas systématique dans la mesure où sur les 33 *PtWAKs* comportant ce domaine WAKassoc, seules 15 présentent aussi le domaine GubWAK. En effet, 8 protéines codées par des *PtWAK*-gènes courts ne possèdent que le domaine WAKassoc et 7 protéines de type WAK-RLK présentent le domaine WAKassoc sans le domaine GubWAK.

Une analyse fonctionnelle des domaines WAK et WAKassoc reste donc à réaliser. En ce qui concerne le domaine WAKassoc, sa richesse en cystéines laisse supposer une possibilité de dimérisation avec d'autres protéines par l'intermédiaire de ponts disulfures. L'importance physiologique de l'homo- et l'hétérodimérisation de protéines de type RLK a auparavant été mise en évidence, par exemple lors de la formation du complexe CLAVATA dans les méristèmes apicaux (Tichtinsky *et al.*, 2003). En effet, ce complexe est formé de deux protéines, l'une transmembranaire de type RLK (CLV1) et l'autre membranaire avec un domaine extracellulaire (CLV2). Cet hétérodimère formé à l'aide de ponts disulfures se lie à un second hétérodimère identique par l'intermédiaire d'une protéine extracellulaire de type RLP (CLV3). La liaison de CLV3 permet à ce complexe d'être actif.

### 5.3. Analyse phylogénétique des WAKs chez *Populus trichocarpa*

Pour l'analyse phylogénétique des *PtWAKs*, nous ciblons volontairement les calculs sur le domaine kinase, soit 67 séquences protéiques *Populus trichocarpa* (Figure 13). Dans cette analyse, les gènes regroupés sous forme de « cluster » au niveau génomique se retrouvent au sein de groupes monophylétiques distincts, ce qui suggère une évolution commune de ces WAKs, issues d'événements multiples de duplication de gènes. Cette même tendance a également été retrouvée chez le riz (Zhang *et al.*, 2005). En effet, les gènes présents sous la



forme de « cluster » montrent une forte similarité de séquence. La duplication des gènes est un phénomène connu et a particulièrement été étudié dans la famille des RLK (Lethi-Shiu *et al.*, 2009). Il traduirait une meilleure capacité d'adaptation des plantes à répondre aux contraintes environnementales biotiques et abiotiques (Lethi-Shiu *et al.*, 2012).

L'analyse, bien que réalisée uniquement sur le domaine kinase, montre de manière très intéressante un regroupement de protéines possédant les différents motifs extracellulaires EGF-3, WAK, EGF-Ca<sup>2+</sup> et cEGF au sein de groupes monophylétiques. Ceci suggère des coévolutions simultanées des différents domaines extracellulaires et du domaine kinase. De plus, l'analyse montre que les 2 domaines extracellulaires WAK et WAKassoc ont évolué de manière indépendante car aucune protéine ne présente ces deux domaines simultanément. Le domaine GubWAK est quant à lui présent dans tous les groupes, ce qui suggèrerait son origine plus ancienne chez les plantes.

#### 5.4. Expression des gènes WAKs chez le peuplier *Populus tremula x alba*

Toute l'analyse *in silico* a été conduite sur l'espèce *Populus trichocarpa* qui est la seule espèce de peuplier séquencée (Tuskan *et al.*, 2006). Cependant, pour analyser l'expression des WAKs, nous utilisons le modèle d'étude *Populus tremula x alba* qui présente de nombreux avantages. Cette espèce est transformable génétiquement et cultivable *in vitro*. De plus, elle présente une meilleure adaptation à la culture en serre que l'espèce *P.trichocarpa*. Enfin, pour mener à bien les stimulations gravitropiques, son port dressé reste un critère primordial de choix par rapport au port buissonnant de *P.trichocarpa*.

Afin de répondre à notre hypothèse d'implication de WAKs dans le continuum CPMCW, le clonage des isoformes notées *PtaWAKs* de *Populus tremula x alba* s'est concentré sur les 68 WAKs de type RLK car elles présentent à la fois le domaine de liaison aux pectines et le domaine kinase (Tableau 2). A partir des clones des ESTs des bases de données, 26 couples d'amorces spécifiques de ces isoformes ont été dessinés (Tableau 3). Neuf couples d'amorces ont permis de détecter une expression sur un mix d'ADNc gravitropique (données non montrées). Le faible nombre de couples d'amorces qui amplifient des WAKs dans la tige suggère que certaines WAKs puissent avoir des expressions spécifiques de certains tissus ou organes comme les *AtWAKs*, (He *et al.*, 1999 ; Wagner et Kohorn, 2001). Toutefois, contrairement aux *AtWAKs*, l'expression tissulaire des 9 *PtaWAKs* analysées n'est pas tissu- ou organe-spécifique (Figure 14). Les profils d'expression sont comparables à ceux des gènes *AtWAK-like* (Verica *et al.*, 2003). Les différentes isoformes *PtaWAKs* analysées sont exprimées dans la plupart des tissus. De façon globale, l'expression est plus forte dans les





limbes en croissance pour une majorité des isoformes suivies (*PtaWAK4*, *PtaWAK5*, *PtaWAK10*, *PtaWAK13*, *PtaWAK15* et *PtaWAK18*). Cela peut être mis en relation avec le rôle des protéines WAKs dans le contrôle de l'expansion cellulaire (Lally *et al.*, 2001 ; Kohorn *et al.*, 2006) très importante au niveau de ce tissu. Toutefois, le rôle de ces isoformes dans l'expansion cellulaire reste à démontrer.

Bien que l'expression de la plupart des isoformes étudiées soit relativement plus faible dans les tissus du xylème mature (*PtaWAK4*, *PtaWAK5*, *PtaWAK7*, *PtaWAK10* et *PtaWAK19* ; Figure 14), l'expression de la plupart de ces gènes est modulée dans ce tissu (bois) suite à un stimulus gravitropique (*PtaWAK4*, *PtaWAK5*, *PtaWAK7* et *PtaWAK10* ; Figure 15). L'étude de l'expression de gènes WAKs suite à un stimulus gravitropique n'a jamais été décrite dans la littérature. En effet, cette famille multigénique n'a été étudiée que chez des espèces non ligneuses (*A. thaliana* et le riz), qui ont un cycle de vie court. L'expression des différents gènes WAKs chez le peuplier lors d'un stimulus gravitropique ne permet pas d'observer de pattern d'expression type. L'expression est réprimée dans une majorité des *PtaWAKs* analysées aussi bien au niveau de l'écorce que du xylème. Cela laisse supposer un rétrocontrôle négatif de l'expression de ces gènes suite à un stimulus gravitropique. Cependant, certaines isoformes montrent une surexpression. De telles modulations laissent supposer des actions complémentaires des différentes isoformes dans les premières étapes de réponse à un stimulus gravitropique. De plus, l'expression différentielle des *PtaWAKs* entre les demi-cylindres supérieur et inférieur de la tige fait de ces WAKs des candidats potentiels agissant dans la cascade de signalisation qui aboutit à la formation du bois de tension, formé du côté supérieur de la tige (Jourez *et al.*, 2001 ; Déjardin *et al.*, 2010).

Toute cette étude d'expression des gènes *PtaWAKs* est réalisée sur une unique répétition biologique. Par conséquent, ces résultats préliminaires restent à confirmer à l'aide de nouvelles expériences biologiques.

## 6. Conclusions – Perspectives

Une analyse *in silico* chez *Populus trichocarpa* nous a permis d'identifier 120 gènes *PtWAKs*. Parmi ceux-ci, 68 sont des kinases de type récepteurs (*PtWAK-RLK*), 21 sont des kinases cytoplasmiques (*PtWAK-RLCK*), 18 sont des protéines de type récepteurs (*PtWAK-RLP*) et 13 ont été déterminés comme des gènes courts (*PtWAK-gènes courts*). Ces gènes sont principalement regroupés en de multiples « clusters » génomiques dont les membres présentent de fortes similarités de séquence entre eux. De nouveaux domaines protéiques codés par ces gènes ont également été mis en exergue, à savoir GubWAK, WAK et



WAKassoc. Les parties codantes de ces différents domaines présentent une co-évolution avec le domaine kinase. Par conséquent, une analyse phylogénétique complémentaire inter-espèces (*Arabidopsis*, riz et peuplier) devra être réalisée afin de préciser exhaustivement l'évolution de ces WAKs. Cette analyse pourra aussi être étendue à d'autres espèces végétales, en intégrant des clades anciens, afin de comprendre la dynamique évolutive globale de la famille des WAKs.

L'expression des gènes WAK chez *Populus tremula* x *alba* est modulée après un stimulus gravitropique et ce différenciellement entre les côtés supérieur et inférieur de la tige. Cette observation suggère que ces WAKs pourraient être impliquées dans la cascade de signalisation aboutissant à la formation du bois de tension. Outre la confirmation des résultats obtenus, l'expression de nouvelles isoformes *PtaWAKs* reste à être analysée pour avoir un aperçu d'un maximum d'isoformes impliquées dans la réponse à un stimulus gravitropique. L'ensemble des analyses de cinétique d'expression des gènes WAKs chez *Populus tremula* x *alba* suite à ce stimulus devrait permettre de cibler les WAKs les plus à même d'intervenir dans la cascade de signalisation conduisant à la formation du bois de tension. Les possibles protéines interagissant avec ces différentes *PtaWAKs* seront alors recherchées afin de comprendre le rôle des WAKs dans la réponse à ce stimulus.



## **Références bibliographiques**

- Bai, J.F., L.A. Pennill, J.C. Ning, S.W. Lee, J. Ramalingam, C.A. Webb, B.Y. Zhao, Q. Sun, J.C. Nelson, J.E. Leach and S.H. Hulbert 2002. Diversity in nucleotide binding site-leucine-rich repeat genes in cereals. *Genome Research*. 12:1871-1884.
- Bailey, T.L., M. Boden, F.A. Buske, M. Frith, C.E. Grant, L. Clementi, J.Y. Ren, W.W. Li and W.S. Noble 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*. 37:W202-W208.
- Baluška, F., J. Samaj, P. Wojtaszek, D. Volkmann and D. Menzel 2003. Cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in plants. Emerging links revisited. *Plant Physiology*. 133:482-491.
- Blancaflor, E.B. and P.H. Masson 2003. Plant gravitropism. Unraveling the ups and downs of a complex process. *Plant Physiology*. 133:1677-1690.
- Brutus, A., F. Sicilia, A. Macone, F. Cervone and G. De Lorenzo. A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:9452-9457.
- Chang, Puryear and Cairney 1993. A Simple and Efficient Method for Isolating RNA from Pine Trees. *Plant Molecular Biology Reporter*. 11:113-116.
- Cosgrove, D.J. and R. Hedrich 1991. Stretch-Activated Chloride, Potassium, and Calcium Channels Coexisting in Plasma-Membranes of Guard-Cells of *Vicia-Faba L.* *Planta*. 186:143-153.
- Coutand, C., M. Fournier and B. Moulia 2007. The gravitropic response of poplar trunks: Key roles of prestressed wood regulation and the relative kinetics of cambial growth versus wood maturation. *Plant Physiology*. 144:1166-1180.
- Coutand, C. and B. Moulia 2000. Biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation: local strain sensing and spatial integration of the signal. *Journal of Experimental Botany*. 51:1825-1842.
- Crowell, E.F., V. Bischoff, T. Desprez, A. Rolland, Y.-D. Stierhof, K. Schumacher, M. Gonneau, H. Hoefte and S. Vernhettes 2009. Pausing of Golgi Bodies on Microtubules Regulates Secretion of Cellulose Synthase Complexes in Arabidopsis. *Plant Cell*. 21:1141-1154.
- Daniel, G., L. Filonova, A.M. Kallas and T.T. Teeri 2006. Morphological and chemical characterisation of the G-layer in tension wood fibres of *Populus tremula* and *Betula verrucosa*: Labelling with cellulose-binding module CBM1(HjCel7A) and fluorescence and FE-SEM microscopy. *Holzforschung*. 60:618-624.
- Decreux, A. and J. Messiaen 2005. Wall-associated kinase WAK1 interacts with cell wall pectins in a calcium-induced conformation. *Plant and Cell Physiology*. 46:268-278.
- Decreux, A., A. Thomas, B. Spies, R. Brasseur, P. Van Cutsem and J. Messiaen 2006. In vitro characterization of the homogalacturonan-binding domain of the wall-associated kinase WAK1 using site-directed mutagenesis. *Phytochemistry*. 67:1068-1079.
- Déjardin, A., F. Laurans, D. Arnaud, C. Breton, G. Pilate and J.-C. Leplé 2010. Wood formation in Angiosperms. *C. R. Biologies* 333:325-334.
- Ding, J.P. and B.G. Pickard 1993. Modulation of Mechanosensitive Calcium-Selective Cation Channels by Temperature. *Plant Journal*. 3:713-720.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32:1792-1797.
- Gierlinger, N. and M. Schwanninger 2006. Chemical imaging of poplar wood cell walls by confocal Raman microscopy. *Plant Physiology*. 140:1246-1254.



- Gillespie, P.G. and R.G. Walker 2001. Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature*. 413:194-202.
- Haswell, E.S., R. Peyronnet, H. Barbier-Brygoo, E.M. Meyerowitz and J.M. Frachisse 2008. Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the Arabidopsis root. *Current Biology*. 18:730-734.
- He, Z.H., I. Cheeseman, D.Z. He and B.D. Kohorn 1999. A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, Wak1-5, are expressed in specific organs of Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*. 39:1189-1196.
- He, Z.H., M. Fujiki and B.D. Kohorn 1996. A cell wall-associated, receptor-like protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 271:19789-19793.
- He, Z.H., D.Z. He and B.D. Kohorn 1998. Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response. *Plant Journal*. 14:55-63.
- Hou, X.W., H.Y. Tong, J. Selby, J. DeWitt, X.X. Peng and Z.H. He 2005. Involvement of a cell wall-associated kinase, WAKL4, in Arabidopsis mineral responses. *Plant Physiology*. 139:1704-1716.
- Humphrey, T.V., D.T. Bonetta and D.R. Goring 2007. Sentinels at the wall: cell wall receptors and sensors. *New Phytologist*. 176:7-21.
- Hynes, R.O. 1999. Cell adhesion: old and new questions. *Trends in Biochemical Sciences*. 24:M33-M37.
- Jaffe, M.J., A.C. Leopold and R.C. Staples 2002. Thigmo responses in plants and fungi. *American Journal of Botany*. 89:375-382.
- Joseleau, J.P., T. Imai, K. Kuroda and K. Ruel 2004. Detection in situ and characterization of lignin in the G-layer of tension wood fibres of *Populus deltoides*. *Planta*. 219:338-345.
- Jourez, B. 1997. Le bois de tension 1. Définition et distribution dans l'arbre. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. 2:100-112.
- Jourez, B., A. Riboux and A. Leclercq 2001. Anatomical characteristics of tension wood and opposite wood in young inclined stems of poplar (*Populus euramericana* cv 'Ghoy'). *Iawa Journal*. 22:133-157.
- Kanneganti, V. and A. K.Gupta 2008. Wall associated kinases from plants - an overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 14:109-118.
- Kanneganti, V. and A. K.Gupta 2011. RNAi mediated silencing of a wall associated kinase, OsiWAK1 in *Oryza sativa* results in impaired root development and sterility due to anther indehiscence. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 17:65-77.
- Knepper, C., E.A. Savory and B. Day 2011. Arabidopsis NDR1 Is an Integrin-Like Protein with a Role in Fluid Loss and Plasma Membrane-Cell Wall Adhesion. *Plant Physiology*. 156:286-300.
- Kohler, A., C. Rinaldi, S. Duplessis, M. Baucher, D. Geelen, F. Duchaussoy, B.C. Meyers, W. Boerjan and F. Martin 2008. Genome-wide identification of NBS resistance genes in *Populus trichocarpa*. *Plant Molecular Biology*. 66:619-636.
- Kohorn, B.D., S. Johansen, A. Shishido, T. Todorova, R. Martinez, E. Defeo and P. Obregon 2009. Pectin activation of MAP kinase and gene expression is WAK2 dependent. *Plant Journal*. 60:974-982.
- Kohorn, B.D., M. Kobayashi, S. Johansen, J. Riese, L.F. Huang, K. Koch, S. Fu, A. Dotson and N. Byers 2006. An Arabidopsis cell wall-associated kinase required for invertase activity and cell growth. *Plant Journal*. 46:307-316.
- Lafarguette, F., J.C. Leple, A. Dejardin, F. Laurans, G. Costa, M.C. Lesage-Descauses and G. Pilate 2004. Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood. *New Phytologist*. 164:107-121.





- Lally, D., P. Ingmire, H.Y. Tong and Z.H. He 2001. Antisense expression of a cell wall-associated protein kinase, WAK4, inhibits cell elongation and alters morphology. *Plant Cell*. 13:1317-1331.
- Lang, I., D.A. Barton and R.L. Overall 2004. Membrane-wall attachments in plasmolysed plant cells. *Protoplasma*. 224:231-243.
- Lehti-Shiu, M.D., C. Zou, K. Hanada and S.H. Shiu 2009. Evolutionary History and Stress Regulation of Plant Receptor-Like Kinase/Pelle Genes. *Plant Physiology*. 150:12-26.
- Lehti-Shiu, M.D., C. Zou and S.-H. Shiu 2012. Origin, Diversity, Expansion History, and Functional Evolution of the Plant Receptor-Like Kinase/Pelle Family. *In* Receptor-like Kinases in Plants Ed. F.T.a.B. Kemmerling. Signaling and Communication in Plants 13.
- Li, H., S.-Y. Zhou, W.-S. Zhao, S.-C. Su and Y.-L. Peng 2009. A novel wall-associated receptor-like protein kinase gene, OsWAK1, plays important roles in rice blast disease resistance. *Plant Mol Biol* 69:337–346.
- Livak, K.J. and T.D. Schmittgen 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*. 25:402-408.
- Lopez, D., G. Bronner, N. Brunel, D. Auguin, S. Bourgerie, F. Brignolas, S. Carpin, C. Tournaire-Roux, C. Maurel, B. Fumanal, F. Martin, S. Sakr, P. Label, J.L. Julien, A. Gousset-Dupont and J.S. Venisse 2012. Insights into Populus XIP aquaporins: evolutionary expansion, protein functionality, and environmental regulation. *Journal of Experimental Botany*. 63:2217-2230.
- Malcolm, H.R., Y.-Y. Heo, D.E. Elmore and J.A. Maurer 2011. Defining the Role of the Tension Sensor in the Mechanosensitive Channel of Small Conductance. *Biophysical journal*. 101:345-352.
- Meier, S., O. Ruzvidzo, M. Morse, L. Donaldson, L. Kwezi and C. Gehring 2012. The Arabidopsis Wall Associated Kinase-Like 10 Gene Encodes a Functional Guanylyl Cyclase and Is Co-Expressed with Pathogen Defense Related Genes. *Plos One*. 5
- Morizet, J. and M. Mingeau 1976. Effect of environment on water-uptake, as studied on beheaded exuding tomato. 1. Role of nutrients. *Annals of Agronomy*. 27:183-205.
- Moulia, B., C. Coutand and C. Lenne 2006. Posture control and skeletal mechanical acclimation in terrestrial plants: Implications for mechanical modeling of plant architecture. *American Journal of Botany*. 93:1477-1489.
- Moulia, B. and M. Fournier 2009. The power and control of gravitropic movements in plants: a biomechanical and systems biology view. *Journal of Experimental Botany*. 60:461-486.
- Murashige, T. and F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*. 15:473-496.
- Nishikubo, N., T. Awano, A. Banasiak, V. Bourquin, F. Ibatullin, R. Funada, H. Brumer, T.T. Teeri, T. Hayashi, B. Sundberg and E.J. Mellerowicz 2007. Xyloglucan endo-transglycosylase (XET) functions in gelatinous layers of tension wood fibers in poplar - A glimpse into the mechanism of the balancing act of trees. *Plant and Cell Physiology*. 48:843-855.
- Novaes, R.M.L., J.G. Rodrigues and M.B. Lovato 2009. An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. *Genetics and Molecular Research*. 8:86-96.
- Pfaffl, M.W., A. Tichopad, C. Prgomet and T.P. Neuvians 2004. Determination of stable housekeeping genes , differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*. 26:509–515.



- Price, C.E., A. Kocerd, S. Kola, J.P.v.d. Berg and A.J.M. Driessen 2011. In vitro synthesis and oligomerization of the mechanosensitive channel of large conductance, MscL, into a functional ion channel. *FEBS Letters*. 585:249-254.
- Punta, M., P.C. Coghill, R.Y. Eberhardt, J. Mistry, J. Tate, C. Bournnell, N. Pang, K. Forslund, G. Ceric, J. Clements, A. Heger, L. Holm, E.L.L. Sonnhammer, S.R. Eddy, A. Bateman and R.D. Finn 2012. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*. 40:D290-D301.
- Schopfer, P. 2006. Biomechanics of plant growth. *American Journal of Botany*. 93:1415-1425.
- Sivaguru, M., B. Ezaki, Z.H. He, H.Y. Tong, H. Osawa, F. Baluska, D. Volkmann and H. Matsumoto 2003. Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 132:2256-2266.
- Somerville, C., S. Bauer, G. Brininstool, M. Facette, T. Hamann, J. Milne, E. Osborne, A. Paredez, S. Persson, T. Raab, S. Vorwerk and H. Youngs 2004. Toward a systems approach to understanding plant-cell walls. *Science*. 306:2206-2211.
- Stenflo, J., Y. Stenberg and A. Muranyi 2000. Calcium-binding EGF-like modules in coagulation proteinases: function of the calcium ion in module interactions. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1477:51-63.
- Stone, J.M. and J.C. Walker 1995. Plant Protein-Kinase Families and Signal-Transduction. *Plant Physiology*. 108:451-457.
- Telewski, F.W. 2006. A unified hypothesis of mechanoperception in plants. *American Journal of Botany*. 93:1466-1476.
- Tichtinsky, G., V. Vanoosthuysse, J.M. Cock and T. Gaude 2003. Making inroads into plant receptor kinase signalling pathways. *Trends in Plant Science*. 8:231-237.
- Tuskan, G.A., S. DiFazio, S. Jansson, J. Bohlmann, I. Grigoriev, U. Hellsten, N. Putnam, S. Ralph, S. *et al.* 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*. 313:1596-1604.
- Untergasser, A., H. Nijveen, X. Rao, T. Bisseling, R. Geurts and J.A.M. Leunissen 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*. 35:W71-W74.
- Verica, J.A., L. Chae, H.Y. Tong, P. Ingmire and Z.H. He 2003. Tissue-specific and developmentally regulated expression of a cluster of tandemly arrayed cell wall-associated kinase-like kinase genes in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 133:1732-1746.
- Verica, J.A. and Z.H. He 2002. The cell wall-associated kinase (WAK) and WAK-like kinase gene family. *Plant Physiology*. 129:455-459.
- Wagner, T.A. and B.D. Kohorn 2001. Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. *Plant Cell*. 13:303-318.
- Wouters, M.A., I. Rigoutsos, C.K. Chu, L.L. Feng, D.B. Sparrow and S.L. Dunwoodie 2005. Evolution of distinct EGF domains with specific functions. *Protein Science*. 14:1091-1103.
- Zhang, S.B., C. Chen, L. Li, L. Meng, J. Singh, N. Jiang, X.W. Deng, Z.H. He and P.G. Lemaux 2005. Evolutionary expansion, gene structure, and expression of the rice wall-associated kinase gene family. *Plant Physiology*. 139:1107-1124.



## Annexes

Nomenclature	Annotation du JGI v2.0 de l'assemblage v2 du génome	Position sur le scaffold  rouge : modifications par rapport au scaffold prédit sur phytozome	Structure
			<i>Pt</i> WAK-RLK
			<i>Pt</i> WAK-RLCK
			<i>Pt</i> WAK-RLP
<b>Séquences localisées sur des groupes de liaison représentatifs des 19 chromosomes</b>			
PtWAK1	POPTR_0001s03190.1	2576259 - 2579267	TM-GubWAK-WAK-EGFca-TM-kinase
PtWAK2	POPTR_0001s03210.1	2632926 - 2637103	TM-GubWAK-WAK-cEGF-EGFca-TM-kinase
PtWAK3	POPTR_0001s03220.1	2640664 - 2641487	No domain
PtWAK4	POPTR_0001s03230.1	2656671 - 2657758	TM-kinase
PtWAK5	POPTR_0001s03240.1	2662811 - 2665405	TM-GubWAK-WAK-EGFca-TM-kinase
PtWAK6	POPTR_0001s07540.1	5659535 - 5663550	TM-GubWAK-WAK-EGFca-TM-kinase
PtWAK7	POPTR_0001s07550.1	5673375 - 5677204	TM-GubWAK-WAK-EGFca-TM-kinase
PtWAK8	POPTR_0001s07560.1	5678953 - 5680706	GubWAK-WAK
PtWAK9	POPTR_0001s07590.1	5739494 - 5740383	TM-GubWAK-WAK
PtWAK10	POPTR_0001s07620.1	5760197 - 5765588	TM-GubWAK-WAK-EGFca-TM-kinase
PtWAK11	POPTR_0001s07630.1	5767817 - 5769025	TM-kinase
PtWAK12	POPTR_0001s07640.1	5781559 - 5782669	GubWAK-WAK-EGFca-TM
PtWAK13	POPTR_0001s07650.1	5790867 - 5793481	TM-GubWAK-WAK-EGFca-TM-kinase
PtWAK14	POPTR_0002s05990.1	3971624 - 3976408	TM-kinase
PtWAK15	POPTR_0002s07650.1	5229691 - 5233197	TM-GubWAK-EGFca-TM-kinase
PtWAK16	POPTR_0002s07660.1	5237439 - 5240768	TM-GubWAK-EGFca-TM-kinase
PtWAK17	POPTR_0002s07670.1	5253409 - 5256765	TM-GubWAK-EGFca-TM-kinase
PtWAK18	POPTR_0002s13210.1	9837995 - 9841115	TM-GubWAK-EGF3-TM-kinase
PtWAK19	POPTR_0003s18390.1	17488030 - 17488597	TM-GubWAK-TM
PtWAK20	POPTR_0003s18400.1	17492835 - 17493810	TM-GubWAK-TM
PtWAK21	POPTR_0003s18410.1	17498945 - 17502178	TM-GubWAK-EGFca-TM-kinase
PtWAK22	POPTR_0003s18440.1	17517834 - 17520554	GubWAK-WAK-EGFca-TM-kinase
PtWAK23	POPTR_0003s18450.1	17525714 - 1752716	TM-GubWAK-WAK
PtWAK24	POPTR_0003s18470.1	17540085 - 17541825	kinase
PtWAK25	POPTR_0003s18480.1	17543588 - 17546366	GubWAK-WAK-EGFca-TM-kinase
PtWAK26	POPTR_0003s18490.1	17553612 - 17556438	TM-GubWAK-WAK-EGFca-TM-kinase
PtWAK27	POPTR_0003s18500.1	17562320 - 17565834	GubWAK-WAK-EGFca-TM-kinase
PtWAK28	POPTR_0004s09580.1	8113006 - 8120612	TM-GubWAK-WAKassoc-TM-kinase
PtWAK29	POPTR_0004s09590.1	8122069 - 8122605	WAKassoc
PtWAK30	POPTR_0004s09600.1	8126174 - 8127162	kinase
PtWAK31	POPTR_0004s09610.1	8133978 - 8137496	TM-GubWAK-WAKassoc-TM-kinase
PtWAK32	POPTR_0004s09630.1	8141959 - 8146824	TM-WAKassoc-TM-kinase
PtWAK33	POPTR_0004s09640.1	8153738 - 8156793	TM-GubWAK-WAKassoc-TM-kinase
PtWAK34	POPTR_0004s20290.1	19874336 - 19877395	TM-GubWAK-cEGF-EGFca-TM-kinase
PtWAK35	POPTR_0004s20300.1	19883451 - 19886145	GubWAK-cEGF-EGFca-TM-kinase
PtWAK36	POPTR_0004s20330.1	19893004 - 19896163	TM-GubWAK-EGFca-TM-kinase
PtWAK37	POPTR_0004s20340.1	19900908 - 19904441	GubWAK-EGFca-TM-kinase
PtWAK38	POPTR_0004s20350.1	19918028 - 19921519	TM-GubWAK-EGFca-TM-kinase



PtWAK39	<a href="#">POPTR_0004s20360.1</a>	19928244 - 19932369	GubWAK-cEGF-EGFca-TM-kinase
PtWAK40	<a href="#">POPTR_0004s20370.1</a>	19951314 - 19952564	kinase
PtWAK41	<a href="#">POPTR_0004s20380.1</a>	19955284 - <b>19960247</b>	GubWAK-cEGF-EGFca-TM-kinase
PtWAK42	<a href="#">POPTR_0004s20400.1</a>	19967774 - 19972866	GubWAK-EGFca-TM-kinase
PtWAK43	<a href="#">POPTR_0004s20410.1</a>	19990158 - 19993786	GubWAK-EGFca-TM-kinase
PtWAK44	<a href="#">POPTR_0005s13920.1</a>	10905141 - 10909329	TM-GubWAK-EGF3-TM-kinase
PtWAK45	<a href="#">POPTR_0005s15230.1</a>	11993260 - <b>11994079</b>	TM-WAKassoc
PtWAK46	<a href="#">POPTR_0005s15240.1</a>	11997215 - 12001533	TM-GubWAK-WAKassoc-TM-kinase
PtWAK47	<a href="#">POPTR_0005s15250.1</a>	12012559 - <b>12013528</b>	TM-GubWAK-WAKassoc-TM
PtWAK48	<a href="#">POPTR_0005s15260.1</a>	<b>12018157</b> - <b>12019027</b>	GubWAK-WAKassoc
PtWAK49	<a href="#">POPTR_0005s15270.1</a>	12022866 - 12026497	TM-WAKassoc-TM-kinase
PtWAK50	<a href="#">POPTR_0005s15300.1</a>	12043121 - <b>12047893</b>	GubWAK-WAKassoc-TM-kinase
PtWAK51	<a href="#">POPTR_0005s15320.1</a>	12051768 - 12052728	TM-GubWAK-WAKassoc
PtWAK52	<a href="#">POPTR_0005s15360.1</a>	12071616 - 12072455	TM-WAKassoc
PtWAK53	<a href="#">POPTR_0005s15370.1</a>	12075114 - 12078636	GubWAK-WAKassoc-TM-kinase
PtWAK54	<a href="#">POPTR_0005s15380.1</a>	12082932 - 12083809	TM-GubWAK-WAKassoc-TM-kinase
PtWAK55	<a href="#">POPTR_0005s22490.1</a>	21409729 - 21412974	TM-Kinase
PtWAK56	<a href="#">POPTR_0005s22500.1</a>	21419648 - <b>21423317</b>	GubWAK-WAK-TM-Kinase
PtWAK57	<a href="#">POPTR_0006s09120.1</a>	6742256 - 6744655	TM-GubWAK-TM-Kinase
PtWAK58	<a href="#">POPTR_0006s12000.1</a>	9172566 - 9174503	TM-GubWAK-TM-Kinase
PtWAK59	<a href="#">POPTR_0007s11990.1</a>	12330218 - 12335290	TM-GubWAK-TM-Kinase
PtWAK60	<a href="#">POPTR_0008s06030.1</a>	3551322 - 3554989	GubWAK-TM-Kinase
PtWAK61	<a href="#">POPTR_0009s15610.1</a>	12038737 - 12041295	GubWAK-cEGF-EGFca-TM-kinase
PtWAK62	<a href="#">POPTR_0009s15630.1</a>	12046642 - 12051511	TM-GubWAK-TM-Kinase
PtWAK63	<a href="#">POPTR_0009s15650.1</a>	12058000 - 12061039	TM-GubWAK-cEGF-EGFca-TM-kinase
PtWAK64	<a href="#">POPTR_0009s15690.1</a>	12075829 - 12078887	TM-GubWAK-WAK-cEGF-EGFca-TM-kinase
PtWAK65	<a href="#">POPTR_0009s15900.1</a>	12205069 - 12206697	kinase
PtWAK66	<a href="#">POPTR_0010s13070.1</a>	12972910 - <b>12973701</b>	TM-GubWAK-WAKassoc
PtWAK67	<a href="#">POPTR_0010s13080.1</a>	12978282 - 12981039	kinase
PtWAK68	<a href="#">POPTR_0010s13090.1</a>	12983637 - 12985402	TM-GubWAK-WAKassoc
PtWAK69	<a href="#">POPTR_0012s05070.1</a>	4567267 - 4568186	TM-WAKassoc
PtWAK70	<a href="#">POPTR_0012s05080.1</a>	4574075 - 4575163	kinase
PtWAK71	<a href="#">POPTR_0012s05100.1</a>	4584752 - 4589704	TM-WAKassoc-TM-kinase
PtWAK72	<a href="#">POPTR_0014s03810.1</a>	3043506 - 3046691	TM-GubWAK-EGF3-TM-kinase
PtWAK73	<a href="#">POPTR_0014s14570.1</a>	10661028 - 10662368	TM-Kinase
PtWAK74	<a href="#">POPTR_0015s03870.1</a>	3790298 - 3794041	TM-GubWAK-WAKassoc-TM-Kinase
PtWAK75	<a href="#">POPTR_0015s03880.1</a>	3794780 - 3797621	TM-WAKassoc-TM-kinase
PtWAK76	<a href="#">POPTR_0018s04260.1</a>	3600492 - 3603019	TM-Kinase
PtWAK77	<a href="#">POPTR_0018s04270.1</a>	3603934 - 3604689	kinase
PtWAK78	<a href="#">POPTR_0018s14490.1</a>	14676188 - <b>14677514</b>	GubWAK-TM
PtWAK79	<a href="#">POPTR_0018s14500.1</a>	14684035 - 14687872	GubWAK-WAK-TM-Kinase
PtWAK80	<a href="#">POPTR_0018s14510.1</a>	14692387 - 14694856	TM-GubWAK-WAK-TM-Kinase
PtWAK81	<a href="#">POPTR_0018s14520.1</a>	14697282 - 14699676	GubWAK-TM-kinase





Séquences localisées sur des groupes de liaison indépendants (non représentatifs des 19 chromosomes)			
PtWAK82	POPTR_0075s00200.1	28078 - 30263	WAK-TM-kinase
PtWAK83	POPTR_0075s00210.1	43348 - 46111	GubWAK-WAK-TM-kinase
PtWAK84	POPTR_0075s00220.1	46733 - 50001	TM-GubWAK-WAK-TM-kinase
PtWAK85	POPTR_0075s00240.1	57497 - 58876	GubWAK-WAK-EGFca
PtWAK86	POPTR_0097s00290.1	60679 - 62628	GubWAK-EGFca
PtWAK87	POPTR_0103s00200.1	26731 - 30953	GubWAK-EGFca-TM-kinase
PtWAK88	POPTR_0103s00210.1	51885 - 52758	GubWAK
PtWAK89	POPTR_0103s00220.1	65625 - 69179	GubWAK-EGFca-TM-kinase
PtWAK90	POPTR_0112s00200.1	2905 - 6483	TM-GubWAK-WAK-TM-Kinase
PtWAK91	POPTR_0112s00210.1	26424 - 31695	TM-GubWAK-WAK-EGFca-TM-kinase
PtWAK92	POPTR_0112s00230.1	42761 - 45536	GubWAK-WAK-EGFca-TM-kinase
PtWAK93	POPTR_0126s00200.1	1139 - 4762	GubWAK-WAK-TM-kinase
PtWAK94	POPTR_0126s00210.1	7812 - 9380	TM-Kinase
PtWAK95	POPTR_0126s00230.1	15740 - 19521	GubWAK-WAK-TM-Kinase
PtWAK96	POPTR_0126s00240.1	49144 - 50971	GubWAK-WAK-TM-Kinase
PtWAK97	POPTR_0160s00200.1	6437 - 6967	kinase
PtWAK98	POPTR_0160s00210.1	19248 - 20126	TM-GubWAK
PtWAK99	POPTR_0160s00220.1	22114 - 22932	TM-WAKassoc
PtWAK100	POPTR_0160s00230.1	25803 - 29548	TM-GubWAK-WAKassoc-TM-kinase
PtWAK101	POPTR_0160s00240.1	30190 - 32888	WAKassoc-TM-Kinase
PtWAK102	POPTR_0160s00250.1	36679 - 37462	WAKassoc
PtWAK103	POPTR_0160s00260.1	39351 - 39983	TM-GubWAK-WAKassoc
PtWAK104	POPTR_0188s00200.1	832 - 3624	TM-Kinase
PtWAK105	POPTR_0188s00210.1	7534 - 10185	TM-Kinase
PtWAK106	POPTR_0188s00230.1	20445 - 21384	TM-GubWAK-WAKassoc
PtWAK107	POPTR_0273s00200.1	4789 - 8581	GubWAK-EGFca-TM-kinase
PtWAK108	POPTR_0309s00220.1	7595 - 8604	TM-WAKassoc
PtWAK109	POPTR_0316s00220.1	7705 - 8930	TM-Kinase
PtWAK110	POPTR_0373s00210.1	8613 - 12311	TM-WAKassoc-TM-Kinase
PtWAK111	POPTR_0418s00200.1	2328 - 3155	TM-WAKassoc
PtWAK112	POPTR_0418s00220.1	14722 - 16787	TM-GubWAK-WAKassoc-GubWAK
PtWAK113	POPTR_0442s00200.1	5219 - 8063	TM-WAKassoc-TM-Kinase
PtWAK114	POPTR_0442s00210.1	38438 - 39295	TM-GubWAK-WAKassoc
PtWAK115	POPTR_0463s00200.1	1146 - 4002	TM-Kinase
PtWAK116	POPTR_0463s00220.1	10660 - 13498	TM-Kinase
PtWAK117	POPTR_0753s00200.1	539 - 1980	TM-GubWAK-EGFca
PtWAK118	POPTR_1539s00200.1	3301 - 5783	GubWAK-cEGF-EGFca
PtWAK119	POPTR_1809s00200.1	1322 - 4384	TM-GubWAK-WAK-EGFca-TM-kinase
PtWAK120	POPTR_2450s00200.1	2203 - 2843	TM-Kinase

### Annexe 1. Classification des 120 WAKs chez *Populus trichocarpa*

Ce tableau indique la classification des 120 *PtWAKs* en fonction de leur localisation génomique. La position exacte de la séquence génomique codante est indiquée, les valeurs marquées en rouge montrant les corrections effectuées lors de la réannotation manuelle des WAKs que nous avons effectué. La structure protéique est indiquée. Les cases bleues correspondent aux *PtWAK-RLK*, les cases rouges aux *PtWAK-RLCK*, les cases vertes aux *PtWAK-RLP* et les cases blanches aux *PtWAK* (gènes courts).



Nomenclature	EST P.trichocarpa	EST P.tremula x P.alba	EST P.tremula	EST P.alba
	nombre : nom EST	nombre : nom EST	nombre : nom EST	nombre : nom EST
<b>Séquences localisées sur des groupes de liaison représentatifs des 19 chromosomes</b>				
PtWAK2			1 EST : CK095195.1	
PtWAK6			2 ESTs : CK094935.1 CK104803.1	
PtWAK7			2 ESTs : BU891917.1 CK094935.1	
PtWAK14	3 ESTs : DT489244.1 DT496871.1 DT499510.1			
PtWAK18	3 ESTs : DT495071.1 CV252204.1 CV248064.1			
PtWAK19			2 ESTs : DN498446.1 BU863440.1	
PtWAK21			4 ESTs : DN488730.1 CK104077.1 DN498446.1 BU863440.1	
PtWAK27			1 EST : CK104077.1	
PtWAK28	1 EST : CV242354.1			
PtWAK37			3 ESTs : DN494026.1 DN484579.1 CK108696.1	
PtWAK41			1 EST : DN484579.1	
PtWAK44		1 EST: CU229891.1		
PtWAK49	7 ESTs : DT478641.1 CK111990.1 DT481066.1 DT486374.1 DN502230.1 DT481998.1 DT487395.1		1 EST : CK115104.1	
PtWAK51	1 EST : CV235317.1			
PtWAK55	1 EST : DT482185.1	1 EST : CF237258.1		
PtWAK60		1 EST : CV555463.1		
PtWAK66	1 EST : DT487783.1			



PtWAK68	1 EST : DT487783.1			
PtWAK69			2 ESTs : DN496354.1 BU892221.1	
PtWAK71			2 ESTs : DN496354.1 BU892221.1	
PtWAK79		2 ESTs : CU228295.1 CU227638.1		
<b>Séquences localisées sur des groupes de liaison indépendants (non représentatifs des 19 chromosomes)</b>				
PtWAK84			1 EST : CK104077.1	
PtWAK87			3 ESTs : DN493885.1 DN484463.1 DN493946.1	
PtWAK90			3 ESTs : DN498446.1 BU863440.1 DN488730.1	
PtWAK101				1 EST : FN393618.1
PtWAK104	1 EST : CV231888.1			
PtWAK109			2 ESTs : CK104887.1 CK094935.1	
PtWAK119			1 EST : BU891917.1	

### **Annexe 2. Liste des ESTs et des séquences *PtWAKs* correspondantes**

Ce tableau représente le nombre ainsi que le nom des séquences ESTs correspondantes aux isoformes *PtWAKs*. La nomenclature des ESTs correspond à celle des bases de données NCBI.







